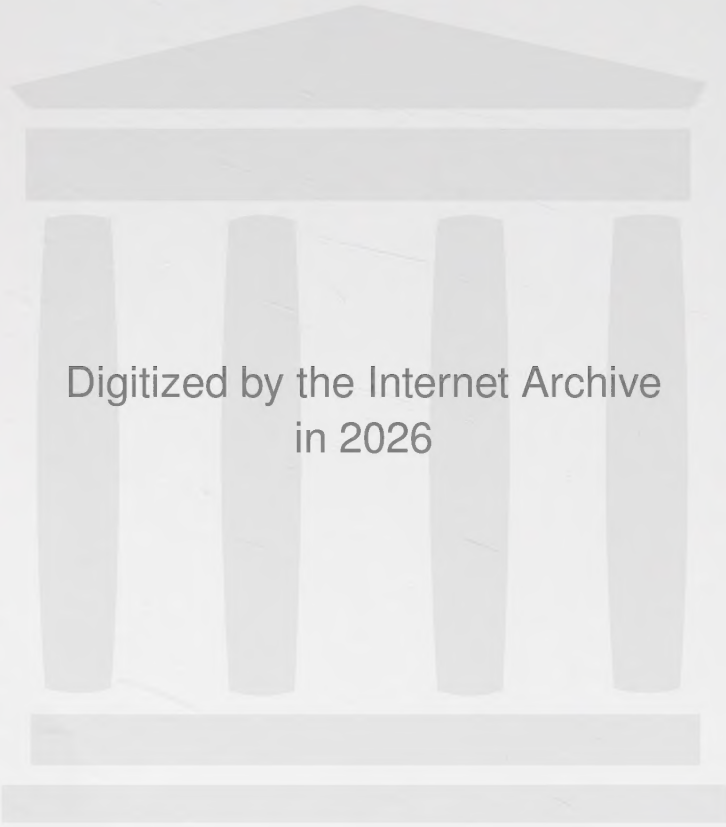


**Über die Beteiligung von de-novo-Synthesen
von Nukleinsäuren und Proteinen an der
Photoinduktion der Carotinoidsynthese**

Erich L. Schrott

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551921_0020

Über die Beteiligung von de-novo-Synthesen
von Nukleinsäuren und Proteinen
an der Photoinduktion der Carotinoidsynthese

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Diplom-Biologe Erich L. Schrott
aus
Singen

Dezember 1973



1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rau
2. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Kandler

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Februar 1974

Einleitung	1
Ergebnisse	6
I. Charakterisierung der lichtabhängigen Carotinoid-synthese von <i>Fusarium oxysporum</i>	6
1. Wachstumsbedingungen für Submerskultur	6
2. Identifizierung der Carotinoide	7
2.1. Extraktion	7
2.2. Trennung der einzelnen Carotinoide	8
2.3. Die Carotinoide von <i>Fusarium oxysporum</i>	8
3. Versuche zur Lichtabhängigkeit der Carotinoidsynthese	9
3.1. Methode	9
3.1.1. Versuchsansatz	9
3.1.2. Quantitative Bestimmung der Carotinoide	11
3.2. Zeitlicher Verlauf der Farbstoffbildung	12
3.3. Abhängigkeit der Carotinoidsynthese von der Belichtungszeit	13
II. Die Wirkung von Transkriptionsgiften auf die Carotinoidsynthese	15
III. Lichtinduzierte Veränderungen innerhalb der Nukleinsäuren	21
1. Methode	21
1.1. Extraktion der Nukleinsäuren	22
1.2. MAK-Chromatographie der Nukleinsäuren	23
1.3. Chromatographie auf BPAK-Säulen	25
1.4. Radioaktivitätsmessung im Säuleneluat	25
1.5. Auftrennung mittels Disk-Elektrophorese	26
1.5.1. Nachreinigung der Nukleinsäuren	27
1.5.2. Elektrophoreseverlauf	27
1.5.3. Färbung	28
1.5.4. Autoradiographie	29
1.5.5. Densitometrie	30

1.6. Isolierung von Polysomen	31
1.7. Affinitätschromatographie auf Nitrozellulosefiltern	32
2. Ergebnisse	33
2.1. MAK-Chromatographie	33
2.2. BPAK-Chromatographie	37
2.3. Lichtinduktion unter Cycloheximid	39
2.4. Disk-Elektrophorese der Nukleinsäuren	43
2.5. Saccharose-Gradientenzentrifugation der Polysomen	45
2.6. Phenolextraktion der Polysomen	47
2.7. Affinitätschromatographie	53
IV. Lichtinduzierte Veränderungen innerhalb der Proteine	57
1. Methode	57
1.1. Versuchsansatz	57
1.2. Extraktion der löslichen Proteine	58
1.3. Extraktion der strukturgebundenen Proteine	58
1.3.1. Extraktion mit Hilfe von Detergentien	58
1.3.2. Herstellung und Extraktion von Acetonpulver	59
1.4. Bestimmung der Proteinkonzentration	61
1.5. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	62
1.6. Trocknung und Autoradiographie; Densitometrie	64
1.7. Messung der Radioaktivität	64
1.8. Immunologische Methoden	64
1.8.1. Extraktion der Antigene	64
1.8.2. Immunisierung	65
1.8.3. Immundoppeldiffusion (Ouchterlony-Test)	65
1.8.4. Immunelektrophorese	66
1.8.5. Immunopräzipitation	67
2. Ergebnisse	68
2.1. Unterschiedliches Verhalten der Licht- und Dunkelproben bei der Extraktion	68
2.2. Die löslichen Proteine	70
2.3. Die strukturgebundenen Proteine	77
2.4. Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen	82
Diskussion	86
Zusammenfassung	91
Literaturverzeichnis	96

2.2. Die löslichen Proteine	70
2.3. Die strukturgebundenen Proteine	77
2.4. Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen	82
Diskussion	86
Zusammenfassung	91
Literaturverzeichnis	96

Verwendete Abkürzungen

DNS	Desoxyribonukleinsäure
RNS	Ribonukleinsäure
m-RNS	messenger-RNS
s-RNS	soluble (lösliche)-RNS
t-RNS	Transfer-RNS
h-rRNS	schwere ribosomale RNS
l-rRNS	leichte ribosomale RNS
m-RNP	messenger-Ribonukleoprotein
ul = ul	Mikroliter
M	molar
mM	millimolar
uM = uM	mikromolar
uCi = uCi	Mikrocurie
n	normal
W	Watt
Lac	Lactose
Fus.	Fusarium
BU	Bromuracil
FU	Fluoruracil
DEP	Diäthylpyrocarbonat
DOC	Natriundesoxycholat
PPO	2,5-Diphenyloxazol
SAS	Natrium-4-aminosalicylat
SDS	Natriumlaurylsulfat
TCA	Trichlooessigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
butyl-PBD	2-(4-t-Butyphenyl)-5-(4-biphenyl)-1,2,3-oxadiazol
CHI	Cycloheximid

Alle verwendeten Chemikalien waren von größtmöglicher Reinheit.

Das Licht spielt bei den Pflanzen neben der Energielieferung für die Photosynthese auch noch bei der Steuerung der Entwicklung eine entscheidende Rolle. Als Mechanismus für derartige Photoregulationen bei Pflanzen wird heute eine differentielle Genaktivierung auf der Grundlage des Jacob-Monod-Modells allgemein akzeptiert und hat bereits Eingang in die Lehrbücher gefunden. Obwohl die meisten Versuchsergebnisse bei den verschiedensten Entwicklungsvorgängen mit diesen Vorstellungen übereinstimmen, konnte bis heute die Kausalkette bei der Photoinduktion nur fragmentarisch aufgeklärt werden.

Bei Pflanzen ist ein direkter Nachweis von spezifischer m-RNS als Folge einer Photoinduktion bisher in keinem Fall gelungen. Hinweise für eine differentielle Genaktivität gaben Hemmstoffversuche bei der Anthocyansynthese in *Petunia hybrida* (HESS, 1964, 1966). An Erbsenkeimlingen ließ sich zum ersten Mal bei höheren Pflanzen eine RNS-Spezies nachweisen, in der man aufgrund ihrer Kurzlebigkeit und ihres Adenin-Reichtums m-RNS vermutete. Gewichtigere Argumente als diese beiden nur unzureichenden Kriterien wurden in Untersuchungen an der Sojabohne erbracht (KEY u. INGLE, 1964), denn hier konnte eine RNS-Fraktion mit einer m-RNS-Funktion korreliert werden. CHROBOCZEK u. CHERRY zeigten 1965, daß die RNS-Extrakte aus 2, 7 und 14 Tage alten Erdnußkotyledonen stadienspezifische Unterschiede aufwiesen. Bei allen diesen Versuchen konnten jedoch nur Indizien für eine Beteiligung de-novo synthetisierter m-RNS gesammelt werden. Einige neuere Untersuchungen, die sich mit Photoinduktionen befaßten (DITTES u. MOHR, 1970; HAREL u. BOGORAD, 1973; SCHRAUDOLPH, pers. Mitt.), wurden ohne Anhaltspunkte für eine

durch das Licht ausgelöste Neusynthese von m-RNS abgeschlossen.

Die Gültigkeit des Jacob-Monod-Modells ist seit langem wahrscheinlich gemacht worden. Bei Dipteren werden differentielle Genaktivitäten in den gewebe- und stadienspezifischen Puff-Mustern direkt sichtbar (Lit. siehe BECKER, 1959). In Bakterien waren die Verhältnisse bei der Enzyminduktion (Lac-Operon) mit ausschlaggebend für die Aufstellung der m-RNS-Hypothese (JACOB u. MONOD, 1961). Auch für höhere Pflanzen ist die Gültigkeit sehr wahrscheinlich; lediglich für photoregulative Prozesse steht ein Nachweis noch aus.

Neben den Erfolgen bei viraler und bakterieller m-RNS ist die Erforschung der m-RNS von eukaryotisch-tierischen Systemen bereits weit fortgeschritten. Die Untersuchung solcher Systeme wie Reticulocyten, Myoblasten und hochspezialisierte Drüsen befindet sich gegenüber den Verhältnissen bei der Photoinduktion von höheren Pflanzen im Vorteil, weil diese Zellen nahezu ausschließlich die jeweilige spezielle Syntheseleistung ausführen und ihre m-RNS bis zu 90 % einheitlich ist. Es sind deshalb bereits Sequenzanalysen z. B. der m-RNS für die leichte Kette des Immunoglobulins geglückt (BROWNLEE et al., 1973).

Ebensogut wie an der Produktion spezifischer m-RNS sollte eine differentielle Genaktivierung auch durch die Synthese qualitativ anderer Proteine faßbar sein. Stadien- bzw. gewebe- oder organspezifische Proteinemuster fanden sich in der Entwicklung von Keimlingen vieler höherer Pflanzen, z. B. in der Erbse (STEWART et al., 1965). Eine durch Gibberellin A_3 ausgelöste de-novo-Synthese von α -Amylase im Aleuron der keimenden Gerste konnten VARNER u. RAN CHANDRA (1964) wahrscheinlich machen. ZUCKER konnte 1969 für Xanthium zeigen, daß die Wirkung des Lichts auf die Phenyl-

alaninammonium-Lyase-Aktivität (PAL) auf einer de-novo-synthese beruht; für *Sinapis* haben SCHOPFER u. HOCK (1971) mit Dichtemarkierungsexperimenten die Neusynthese der PAL noch überzeugender belegt. Die von HOCK u. BEEVERS (1966) an Keimlingen von *Citrullus vulgaris* erarbeiteten Daten sprechen für eine de-novo-Synthese der Isocitrat-Lyase.

Die sich für weitere Untersuchungen über den Mechanismus der Photoregulation anbietenden pflanzlichen Systeme sind durch die Vielschichtigkeit ihrer Reaktionen auf Licht meist zu komplex. Bei Pilzen liegen die Verhältnisse durch das Fehlen des Photosyntheseapparates um etliches günstiger. Die Photoinduktion der Carotinoidsynthese bei dem bereits gut untersuchten Objekt *Fusarium aquaeductuum* (LIT. siehe LANG u. RAU, 1972) wird nach allem, was wir bisher darüber wissen, nicht von anderen lichtgesteuerten Prozessen überlagert.

Für *Fus. aquaeductuum* genügt eine kurze Induktionszeit, um im Gegensatz zu anderen Pilzen (z. B. *Cephalosporium diospyri*; SEVIOUR u. CODNER, 1973) innerhalb von ca. 24 Stunden relativ große Mengen an Carotinoiden zu bilden. Bei dem in den Grundlagen untersuchten Brotschimmel *Neurospora crassa* (RAU, LINDEMANN u. RAU-HUND, 1968) liegt zwar ein noch erheblich rascher arbeitendes Regulations-system vor, jedoch ist die Lichtreaktion bereits mit geringen Lichtmengen zu sättigen, ein Umstand, der nicht bei allen Versuchsanstellungen willkommen ist.

Die kurzen Induktionszeiten ermöglichen eine zeitliche Trennung der ablaufenden Teilprozesse, die als eine temperaturunabhängige Photoinduktion, eine vermutliche Neusynthese von Enzymen und als eigentliche Synthese der Polyenkohlenwasserstoffe charakterisiert werden können. Die beiden letztgenannten Phasen der Wirkungskette sind temperatur- und sauerstoffabhängig und vermögen auch im Dunkeln

abzulaufen. Die Untersuchungen von RAU, (1967b), THEIMER u. RAU, (1970) und von BINDL, LANG u. RAU, (1970) gestatten eine etwaige zeitliche Abgrenzung der Teilprozesse gegeneinander. Die Photoinduktion ist 20 Minuten nach Beginn einer 5-minütigen Belichtung mit Reduktionsmitteln nicht mehr zu hemmen. Eine erste Farbstoffproduktion ist zwischen der 30. und 45. Minute nach Lichtbeginn zu erkennen; ein geringer Teil der Enzyme ist also bereits in Funktion, während die gesamte Enzymsynthese nach etwa 3 Stunden abgeschlossen ist. Nach diesem Zeitpunkt ist eine Zugabe des Proteinsynthesegifts Cycloheximid (CHI) nicht mehr wirksam. Die Zeitdauer der angenommenen m-RNS-Synthese ist bislang auf diesem indirekten Weg nicht bestimmt worden, läßt sich aber aufgrund der bisherigen Befunde auf eine relativ kurze Zeit zwischen Photoinduktion und Enzymsynthese eingrenzen.

Dieses Photoregulationssystem der Carotinoidsynthese bei *Fus. aquaeductum* sollte es deshalb erlauben, sowohl indirekt durch Verwendung von Antimetaboliten als auch darüberhinaus direkt durch die Darstellung einer durch Lichtinduktion erfolgenden de-novo-Synthese spezifischer m-RNS und qualitativ anderer Proteine, dem Ziel nahezukommen, eine differentielle Genaktivierung als Regulationsmechanismus auch für photoregulierte eukaryotisch-pflanzliche Systeme nachzuweisen. Zu diesem Nachweis beizutragen war das Ziel der vorliegenden Arbeit.

Als Grundlage für die geplanten Versuche sollte neben *Fus. aquaeductum* und *Neurospora crassa* noch nach einem weiteren Pilz mit lichtabhängiger Carotinoidsynthese gesucht werden. Als naheliegendes Objekt bot sich *Fusarium oxysporum* an, von dem CARLILE (1956) berichtet, daß der im Dunkeln gehaltene Pilz purpurrot erscheint, während er im Licht orange gefärbt ist; die Färbung werde durch Naphtochinone und Carotinoide verursacht, letztere sollen nur

im Licht gebildet werden.

Für den Nachweis einer lichtinduzierten Neusynthese von m-RNS war es zunächst interessant zu wissen, ob es Transkriptionshemmstoffe gibt, die in der Lage sind, die Carotinoidsynthese zu blockieren. Mit ihrer Hilfe sollte die zeitliche Abgrenzung der bei der Photoregulation ablaufenden Teilprozesse komplettiert werden und auf der Stufe der Transkription, wie mit CHI bei der Translation bereits geschehen, indirekt der Nachweis für eine de-novo-Synthese geführt werden. Darüberhinaus sollte aber vor allem versucht werden, diesen Nachweis direkt zu führen und zwar sowohl für die m-RNS als auch für die Enzyme. Ein von Arbeiten an Bakterien bekannter Kunstgriff, wobei die Organismen aus einem Optimal- in ein Minimalmedium überführt werden — man spricht von einem "step down" —, sollte dabei günstige Bedingungen schaffen. Im Minimalmedium gehen die Stoffwechselvorgänge auf ein Mindestmaß zurück. Induzierte de-novo-Synthesen sollten dabei keine Neusynthesen von Ribosomen u. ä. notwendig machen, sondern sich auf die Synthese der induzierten Produkte selbst beschränken, wodurch die Fütterung radioaktiver Stoffe zu selektiverem Einbau führen müßte.

Für einen Beitrag zur Aufklärung des Mechanismus einer Photoregulation bei Pflanzen ließ demnach das System der lichtinduzierten Carotinoidsynthese bei Pilzen aus den oben geschilderten Gründen (kurze Zeiten für Photoinduktion, schneller Ablauf der Folgeprozesse, Inkubation unter "step down"-Bedingungen) günstigere Voraussetzungen erwarten als die bisher untersuchten Regulationssysteme von Keimlingen grüner Pflanzen.

I. Charakterisierung der lichtabhängigen Carotinoidsynthese von *Fusarium oxysporum*

Für eine quantitative Untersuchung der Carotinoidsynthese von *Fus. oxysporum* SCHLECH. war Voraussetzung, daß in größeren Mengen ein Mycel annähernd gleichen Alters gewonnen werden kann, das sich außerdem möglichst weitgehend homogen suspendieren läßt. Diese Forderungen werden hinreichend erfüllt, wenn die Anzucht des Pilzes in Submerskultur erfolgt. Dabei sollte die Bildung von Sporen unterdrückt werden, weil diese nur schwer zu extrahieren sind und in ihnen die Carotinoidsynthese möglicherweise, ähnlich wie bei *Neurospora crassa*, lichtunabhängig verläuft. Es war zudem wichtig, die Synthese der arteigenen Naphtochinone gering zu halten, da sie, wie entsprechende Vorversuche ergaben, in größeren Mengen die Bestimmung der Carotinoide stören.

1. Wachstumsbedingungen für Submerskultur

Grundnährmedien bei diesen Untersuchungen waren Biomalz, Eierwürze (je 3%) und Fries' Minimalmedium (5 g Aluminiumtartrat; 1 g NH_4NO_3 ; 1 g KH_2PO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,1 g NaCl; 0,1 g CaCl_2). Durch Zusätze von Hefeextrakt und Neopepton (Difco) in wechselnden Konzentrationen wurden daraus Medien verschiedener Zusammensetzung hergestellt und auf Wachstum, Sporenbildung und Carotinoidsynthese des Pilzes getestet. Einen wesentlichen Einfluß auf die Bildung von Sporen hatte der Grad der Durchlüftung des Nährbodens, so daß die Füllhöhe der Anzuchtkolben und die Intensität der Bewegung sorgfältig aufeinander abgestimmt werden mußten.

Von zahlreichen Variationen erwies sich die folgende Methode als günstigste; für die nachstehend dargestellten Untersuchungen wurde der Pilz deshalb stets nach dieser herangezogen:

Mit der Stammkultur, die in Schrägagarröhrchen auf einem Nährboden der Zusammensetzung: 30 g Biomalz (Diamalt), 2 g Neopepton (Difco) und 20 g Agar pro Liter Aqua dest. geführt war, wurde zu jedem Versuchsansatz ein 200 ml-Erlenmeyerkolben beimpft, der 3%ige Biomalzlösung mit einem Zusatz von 0,2 % Neopepton enthielt; der mit diesem Medium erhaltene pH-Wert von 5,3 stellte zugleich das pH-Optimum für das Wachstum von *Fus. oxysporum* in Submerskultur dar. Nach einer Wachstumszeit von 48 Std. wurden je 10 ml der Pilzsuspension in 1000 ml-Erlenmeyerkolben mit 600 ml derselben Nährlösung überführt. Die Anzucht geschah in beiden Fällen in völliger Dunkelheit und konstanter Temperatur ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$) auf einer Schüttelmaschine niedriger Frequenz (60/Min.) und geringer Amplitude (3,5 cm).

2. Identifizierung der Carotinoide

2.1. Extraktion

Nach Abfiltrieren des Mediums (Filtrierpapier) wurde das carotinoidhaltige Mycel in 100 ml-Plastikflaschen überführt und mit ca. 50 g Glasperlen ($\varnothing$ 4,8 mm) in 20 ml Methanol auf einer Schüttelmaschine eine Stunde lang zu feinem Pulver zerschlagen. Durch Zugabe von 50 ml Aceton und nochmaligem 1/2-stündigem Schütteln wurden die Carotinoide vollständig, die Naphtochinone aber nur zum Teil herausgelöst.

Der Farbstoffextrakt wurde über Filtrierpapier unter Nachwaschen mit Aceton von den Mycelresten befreit. In einem 500 ml-Scheidetrichter wurden die Carotinoide mit Hilfe einer 10%igen Ammonsulfatlösung in Petroläther (Kp. 30 - 50 C) übergetrieben.

Der hierbei ebenfalls in den Petroläther übergegangene kleine Anteil der sonst überwiegend in der wässrigen Phase verbleibenden Naphtochinone konnte im ersten der insgesamt drei mit destilliertem Wasser durchgeführten Waschungen durch Zugabe einiger Tropfen 1n KOH wieder aus der Petrolätherphase entfernt werden.

2.2. Trennung der einzelnen Carotinoide

Der auf diese Weise erhaltene Farbstoff stellt nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ein Gemisch verschiedener Carotinoide dar und wird im folgenden als "Gesamtfarbstoff" bezeichnet. Die petrolätherige Lösung dieses Farbstoffgemischs läßt sich im Scheidetrichter durch Versetzen mit gleicher Menge 90%igen Methanols und einigen Tropfen 1n KOH nach kräftigem Schütteln in zwei Phasen verschiedener Zusammensetzung trennen.

Die Auftrennung der epiphasischen Carotinoide erfolgte säulenchromatographisch nach der von BINDL, LANG u. RAU (1970) beschriebenen Methode mit einer Mischung aus $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Merck) und Hyflo-Super-Cel (Roth) im Verhältnis 5:1 (Säulendimensionierung 1,5 x 10 cm). Als Laufmittel diente ein linearer Gradient von 0 - 30 % Benzol in Petroläther. Nach dem Auffangen der beiden ersten Zonen wurde das kompakte Adsorbens aus der Säule herausgedrückt, die Farbstoffbanden auseinander geschnitten, in Aceton und etwas wasserfreiem Methanol eluiert und die Lösungen mit einer Glasfildernutsche G4 gereinigt.

2.3. Die Carotinoide von *Fusarium oxysporum*

Nach re-Chromatographie der einzelnen Zonen erfolgte die Identifizierung anhand der Absorptionsspektren im sichtbaren und UV-Bereich. Die Spektren wurden in Hexan und Benzol mit einem BECKMAN-Spektralphotometer Modell DB und dazuge-

hörigem 10-Zoll-Schreiber aufgenommen. Außerdem erfolgte eine Co-Chromatographie der Pigmente mit Farbstoffen, die aus *Fus. aquaeductuum* gewonnen wurden und deren Identität bekannt ist (BINDL, LANG u. RAV, 1970).

Der bei der Phasenverteilung in der oberen Petrolätherschicht, der Epiphase, verbleibende Farbstoff besteht wiederum aus mehreren Carotinoiden, während in der unteren basischen Methanolschicht, der Hypophase, nur ein Pigment zu finden ist, das als Neurosporaxanthin identifiziert werden konnte. Da es eine Carboxylgruppe im Molekül besitzt, wird es bei der Säulenchromatographie sehr stark an das Adsorbens gebunden und bleibt am Start zurück. Die identifizierten Farbstoffe sind im einzelnen in Tab. 1 aufgeführt.

3. Versuche zur Lichtabhängigkeit der Carotinoidsynthese

3.1. Methode

3.1.1. Versuchsansatz

Die Anzucht des Pilzes erfolgte in der in Abschnitt I.1. beschriebenen Weise. Bei schwachem Rotlicht (Leuchtstoffröhren Philips TL 40 W, Lichtfarbe 15, hinter roter Plexiglasscheibe Röhm & Haas, Darmstadt, Nr. 501) erfolgte 72 Std. nach dem Animpfen der Versuchsansatz durch Abfiltrieren der Nährlösung auf einem Büchnertrichter unter mehrmaligen Waschen und anschließender Resuspendierung des Mycels in $1/60$ m KH_2PO_4 und 2 % Glucose (800 ml pro AnzuchtKolben). Von der nach kräftigem Schütteln erhaltenen weitgehend homogenen Suspension wurden jeweils 200 ml in 250 ml-Gaswaschflaschen gefüllt.

Zur Trockengewichtsbestimmung wurden je 20 ml der Suspension und des Puffers 24 Std. bei $120^{\circ}C$ getrocknet, im Exsikkator über $CaCl_2$ abgekühlt und bis zum Erreichen der Gewichtskonstanz darin aufbewahrt. Etwa 5 Min. vor Beginn der

Zone, Farbstoff und Herkunft	Hexan	Benzol	E 1% 1cm
<u>Neurosporaxanthin</u>			
F. oxysporum	- ; 476; 505;	- ; 492; - ;	
F. aquaed.	- ; 478; 508;	- ; 492; - ;	
Literatur	- ; 477; 505;	- ; 492; - ;	1 715
(Petroläther)	(AASEN u. JENSEN, 1965)	(BINDL, 1968)	(AASEN u. JENSEN, 1965)
<u>trans-Torulin</u>			
F. oxysporum	459; 486; 518;	472; 501; 534;	
F. aquaed.	458; 487; 519;	- ; 502; 534;	
Literatur	455; 486; 520;	470; 503; 541;	2 680
(Petroläther)	(PONNER, SANDO- VAL, TANG u. ZECHMEISTER, 1946)	(KARRER u. RUTSCHMANN, 1946)	(SIMPSON, NAKAYAMA u. CHICHESTER, 1964)
<u>cis-Torulin</u>			
F. oxysporum	452; 475; 504;	466; 491; 520;	
F. aquaed.	455; 477; 509;	465; 495; 526;	2 040 (BINDL, 1968)
<u>Lycopin</u>			
F. oxysporum	445; 473; 502;	457; 485; 519;	
F. aquaed.	448; 473; 504;	459; 487; 518;	
Literatur	446; 474; 506;	455; 487; 522;	3 450
	(GOODWIN, 1955)	(KARRER u. JUCKER, 1948)	(DAVIES, 1965)
<u>Neurosporin</u>			
F. oxysporum	416; 439; 468;	426; 452; 481;	
F. aquaed.	416; 439; 468;	425; 452; 483;	
Literatur	416; 440; 470;		2 095
	(ISLER u. SCHUDEL, 1963)		(RAVEN, 1964)
<u>γ-Carotin</u>			
F. oxysporum	436; 461; 491;	449; 475; 507;	
F. aquaed.	437; 462; 492;	448; 475; 508;	
Literatur	437; 462; 494;	447; 477; 510;	2 760
	(ISLER u. SCHUDEL, 1963)	(KUHN u. BROCK- mann, 1933)	(GOODWIN, 1956)
<u>β-Carotin</u>			
F. oxysporum	374; 398; 422;		
F. aquaed.	374; 398; 423;		
Literatur	378; 400; 425;		2 500
	(GOODWIN, 1955)		(NASH, QUACKEN- BUSH u. PORTER, 1948)

Tab. 1: Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten der Carotinoide aus *Fusarium oxysporum*, im Vergleich mit demselben Farbstoff aus *Fus. aquaeductum* und Werten aus der Literatur.

Belichtung begann die Sauerstoffversorgung des Mycels vermittels eines ständigen Gasdurchstroms, der zudem für gleichmäßige Exposition der Hyphen während der Belichtung sorgte.

Als Lichtquellen dienten zwei Beleuchtungseinheiten, bestehend aus je drei horizontal übereinander angeordneten Leuchtstoffröhren (Osram, 65 W, Lichtfarbe 15, mit Reflektor), die eine Lichtintensität von 16 000 Lux lieferten. Nach der Belichtung wurde die Sauerstoffversorgung durch Luftzufuhr ersetzt und das Mycel zur Farbstoffsynthese bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen.

3.1.2. Quantitative Bestimmung der Carotinoide

Die Extraktion der gebildeten Carotinoide geschah in der in Abschnitt I.2.1. dargestellten Weise. Um das in der methanolischen Hypophase vorliegende Neurospora-xanthin zur Messung vollständig in Petroläther überzuführen, mußte ein Umweg über Benzol beschritten werden: 10%ige Ammoniumsulfatlösung und mehrere Tropfen Eisessig ließen das Neurospora-xanthin rasch in Benzol übertreten. Epi- und Hypophase wurden nach mehrmaligem Waschen mit destilliertem Wasser am Vakuumrotationsverdampfer (BÜCHI ROTAVAPOR R) bei 24°C eingedampft, wobei das Benzol, das eine bathochrome Verschiebung des Farbstoffspektrums bewirkt, durch wiederholtes Aufnehmen der Pigmente in Petroläther und erneutes Eindampfen gänzlich entfernt werden mußte.

Der Farbstoff wurde dann in einer definierten Menge Petroläther aufgenommen und seine Absorption in einem Spektrophotometer (ZEISS PMQ II oder HITACHI 200-10-ELMER, Modell 132) zwischen 450 nm und 490 nm gemessen. Die Extinktion im Absorptionsmaximum diente als Maß für die gebildete Farbstoffmenge.

3.2. Zeitlicher Verlauf der Farbstoffbildung

Wächst das Mycel von *Fus. oxysporum* in völliger Dunkelheit heran, so enthält es bereits Carotinoide, deren Menge jedoch sehr gering ist. Eine kurze Belichtung genügt, um die Farbstoffbildung auf ein Vielfaches zu erhöhen.

In Abb. 1 ist der zeitliche Verlauf der Carotinoidsynthese im Dunkeln und nach Lichtinduktion dargestellt. Es ist daraus zu ersehen, daß die im Dunkeln pro Zeiteinheit gebildete Farbstoffmenge annähernd gleich bleibt. Nach der Belichtung ist der Farbstoffgehalt zunächst geringfügig erniedrigt. Die Farbstoffbildung beginnt nach einer lag-Phase von $1\frac{1}{2}$ Std., nimmt dann sehr rasch mit sigmoidem Kurvenverlauf zu, um nach etwa 36 Std. zu einem Maximum im Farbstoffgehalt zu führen; eine Nachreaktion über 48 Std. hinaus läßt diesen wieder etwas absinken.

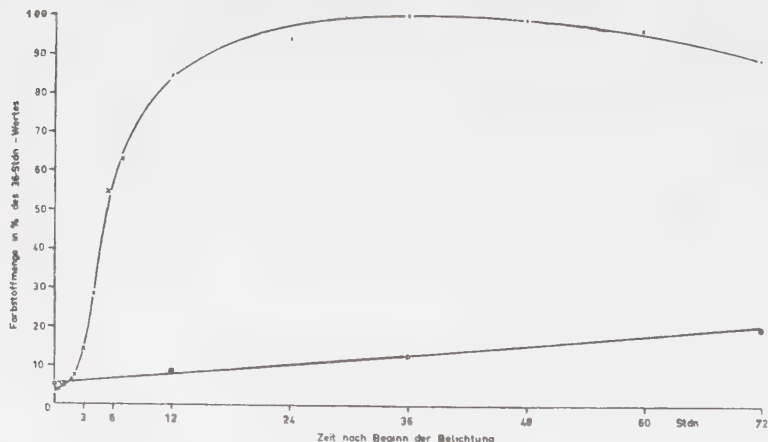


Abb. 1: Verlauf der Farbstoffbildung im Dunkeln (-o-o-) und nach 10-minütiger Belichtung (-x-x-). Mittelwerte aus 5 Versuchen.

3.3. Abhängigkeit der Carotinoidsynthese von der Belichtungszeit

Im Gegensatz zu Organismen wie *Neurospora crassa* (RAU, LINDEMANN u. RAU-HUND, 1968) und *Mycobacterium* sp. (RILLING, 1962) konnte bei *Fus. aquaeductuum* (THEIMER, 1968) keine Sättigung der Lichtreaktion erreicht werden. Zur Untersuchung der Frage, wie sich *Fus. oxysporum* in dieser Beziehung verhält, wurden Pilzproben verschieden lang belichtet und danach noch jeweils 24 Std. im Dunkeln belassen. Aus den in Abb. 2 dargestellten Ergebnissen ist ersichtlich, daß eine logarithmische Erhöhung der Belichtungszeit bis

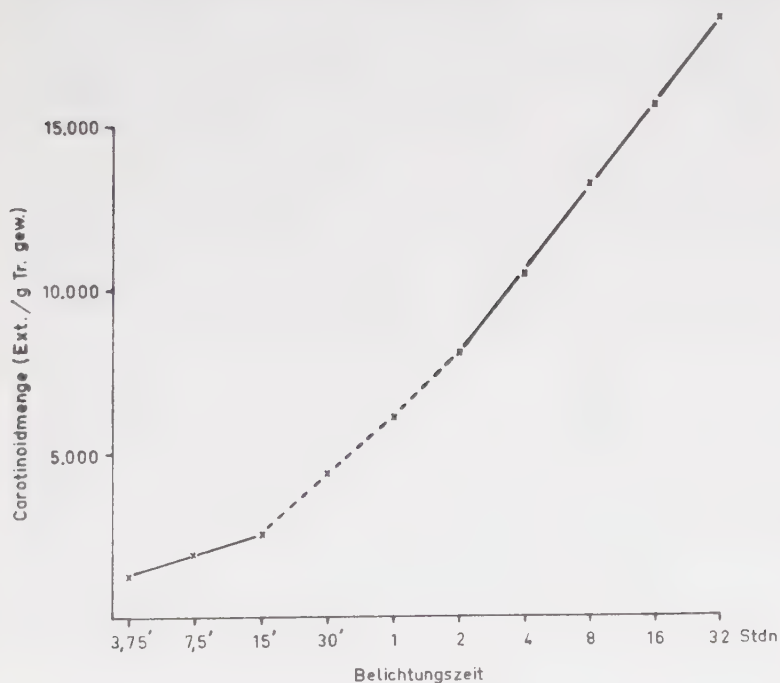


Abb. 2: Gesamtfarbstoffmenge in Abhängigkeit von der Belichtungszeit. Mittelwerte aus 4 Versuchen.

15 Min. einen linearen Anstieg der synthetisierten Farbstoffmenge zur Folge hat, der dann bei 2 Std. Belichtungszeit in einen zweiten linearen Ast einmündet. Dieser Verlauf entspricht den Ergebnissen von THEIMER (1968) an *Fus. aqueductum*, der ebenfalls ab einer Lichtmenge von etwa 1200 000 Lux.min eine erhöhte Wirkung der eingestrahlten Energie beobachtete. Allerdings ist in dem hier vorliegenden Fall der Übergang nicht so abrupt. Einen noch fließenderen Übergang hat BUCK (1972) an *Fus. coeruleum* erhalten. Eine Erklärung des Phänomens ist aufgrund der bisher erarbeiteten Ergebnisse nicht möglich.

II. Die Wirkung von Transkriptionsgiften auf die Carotinoid-synthese

Wie bereits in der Einleitung dargelegt wurde, sollte durch den Einsatz verschiedenster Transkriptionsgifte versucht werden, Hinweise auf die Beteiligung einer m-RNS beim Mechanismus der Photoinduktion der Carotinoidsynthese zu erhalten. In vielen Fällen ist die Wirkungsweise solcher Substanzen nicht spezifisch. Proflavin z. B. schiebt sich mit seiner chromophoren Gruppe in die Internukleotidräume der DNS-Doppelhelix und führt durch diese Intercalation zu Tripletteränderungen; auf der anderen Seite ist aber bei *E. coli* für Proflavin in niedrigen Konzentrationen eine selektive Hemmung der DNS-abhängigen RNS-Polymerase nachgewiesen (RICHARDSON, 1966); dabei wird die Bildung des Enzym-DNS-Komplexes unterbunden.

Eine Aufschlüsselung der eingesetzten Inhibitoren nach ihrer Wirkungsweise wurde aus solchen Gründen in der Aufstellung in Tab. 2 unterlassen; lediglich die Basenanalogen sind getrennt aufgeführt, weil sie eine Neusynthese nicht verhindern, sondern nur zu einer "unleserlichen" m-RNS führen.

In den folgenden Versuchen wurden eine Reihe von Konzentrationen im Bereich von 3 mM bis 1 μ M der einzelnen Antimetabolite zu verschiedenen Zeiten vor, während und nach einer 10-minütigen Belichtung zugegeben und die Proben für 24 Std. zur Synthese der Carotinoide im Dunkeln belassen. Die Menge an Farbstoff gegenüber der unbehandelten Kontrolle diente als Maß für die erzielte Hemmwirkung.

Unter den Basenanalogen zeigten nur Bromuracil (BU) und Fluoruracil (FU) eine Hemmwirkung: der Carotinoidgehalt sank auf 65 % der unbehandelten Kontrollen. Werden BU und

Synthesehemmstoffe	unwirksam		hemmt		fördert	
	F.a.	F.o.	F.a.	F.o.	F.a.	F.o.
Actinomycin D			190	190	1,9	1,9
α -Amanitin	X					
Mitomycin				720	7,2	7,2
Rifampicin			1,0	1,0		
Acridinorange			1000		1,0	100
Proflavin			10		3,0	
Ethidiumbromid			1,0		1,0	
Natriumnitrit	X					
Basenanaloge						
8-Azaguanin	X					
Bromuracil			10	10		
5-Diazouracil	X					
Fluoruracil			50	50		
Thiouracil	X					

Tab. 2: Wirkung der getesteten Antimetabolite auf die Carotinoidsynthese von *Fus. aquaeductuum* (F.a.) und *Fus. oxysporum* (F.o.). Angabe der wirksamen Konzentrationen in μM .

FU aber 1 Std. vor Belichtung zugegeben, so ist keine reduzierte Farbstoffsynthese mehr zu beobachten. Vermutlich nutzt der Pilz die Substanzen nach einer Entgiftung als Stickstoffquelle. Unter Actinomycin D wurde selbst bei der höchsten verwendeten Konzentration (190 μM) bei *Fus. aquaeductuum* noch 41 %, bei *Fus. oxysporum* 29 % der Farbstoffmenge von Kontrollen synthetisiert. Mitomycin hemmte lediglich bei *Fus. oxysporum* geringfügig; ebenso gering war die Hemmung durch Rifampicin bei beiden Organismen.

Höhere Konzentrationen unter anderem von Rifampicin und Ethidiumbromid bewirken neben einer augenscheinlich allgemeinen Schädigung, durch die rote Eigenfärbung dieser Stoffe

eine Absorption des wirksamen Blauanteils des eingestrah-
ten Lichts, sodaß schon daraus eine Reaktionsminderung
resultiert.

Bei niedrigen Konzentrationen wirken einige Substanzen
fördernd auf die Carotinoidsynthese. Doppeleintragungen
in Tab. 2 sind durch derartige Konzentrationsabhängige
Effekte begründet.

Als Beispiel für eine solche Konzentrationsabhängigkeit
sollen hier nur die mit Proflavin erzielten Ergebnisse
dargestellt werden (Abb. 3). Proflavin wird zu den photo-
dynamischen Farbstoffen gezählt, von denen sich die Mehr-
zahl strukturell vom Anthracen ableiten läßt. Die Absorp-
tion von Lichtquanten bewirkt eine Anhebung in einen ener-

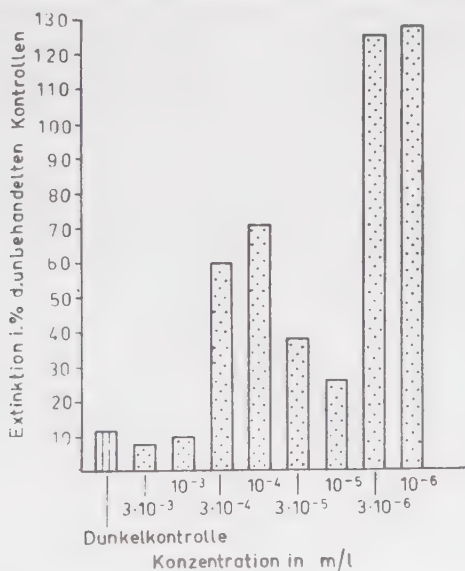


Abb. 3: Einfluß verschiedener Proflavinkonzentrationen auf
die Carotinoidsynthese. Proflavinzugabe 30 Min.
vor Belichtungsbeginn. Mittelwerte aus 6 Versuchen.

giereichen Zustand. Über Zwischenstufen wird ein unbeständiges Radikalperoxid gebildet, das den Sauerstoff auf einen geeigneten Akzeptor übertragen kann. Solange eine Sättigung des Photoakzeptors nicht erreicht ist – und bei den bis jetzt untersuchten *Fusarium*-arten konnte ja keine Sättigung erreicht werden – resultiert daraus bei gleicher Belichtung eine gesteigerte Carotinoidsynthese, wenn dieser zusätzliche Sauerstoff auf den Photoakzeptor übertragen wird. Es ist also zu erwarten, daß sich dieser photodynamische Effekt von Proflavin mit einer Hemmwirkung überlagert.

Den vorliegenden Ergebnissen zufolge (Abb. 4a) wirkt Proflavin in einer Konzentration von 10 mM nur dann hemmend, wenn es während einer 1/2-stündigen Belichtung anwesend

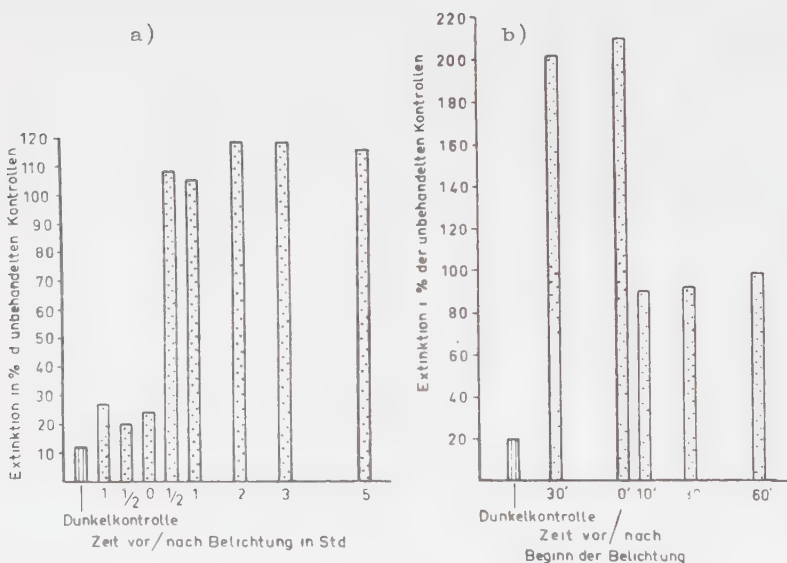


Abb. 4: Proflavinzugabe zu verschiedenen Zeiten vor und nach Beginn einer a) 30-minütigen, b) 10-minütigen Belichtung. Mittelwerte aus 3 Versuchen.

ist, nicht dagegen, wenn es erst nach der Belichtung zugegeben wird. Nimmt man an, daß diese Wirkung auf einer Hemmung der Genaktivierung beruht, so müßte der Transkriptionsvorgang sofort mit Ende der Lichteinstrahlung aufhören. Sowohl die Tatsache, daß eine Sättigung des Lichtakzeptors nicht erfolgt und daher auch das letzte eingestrahelte Photon noch zu einer Lichtreaktion führen kann, als auch die Untersuchungen von BINDL, LANG u. RAU (1970) mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid machen dies aber unwahrscheinlich.

Daß die Proflavinwirkung wohl nicht auf einer Transkriptionshemmung beruht, wird aus den Versuchen mit einer 10-minütigen Belichtung deutlich (Abb. 4b). Die Vorinkubationsdauer von 30 Min. müßte zu denselben Defekten führen, die in der vorherigen Versuchsanstellung die Hemmung bewirkten. Während der nachfolgenden Lichtexposition ist der Induktionsmechanismus aber noch in der Lage, eine 100%ige Förderung der Carotinoidsynthese zu bewirken.

Dieser Befund steht im Gegensatz zu der von BATRA (1964) an *Mycobacterium marinum* beobachteten nahezu vollständigen Blockierung der Carotinoidproduktion nach Zugabe von 80 µg/ml Proflavin sofort nach Beendigung einer 20-minütigen Belichtung. Diese Wirkung ließ sich bei Inhibitorzugabe bis 4 Std. nach Belichtung mit abnehmender Tendenz feststellen. BATRA führt diesen Effekt auf eine Veränderung der Matrizen-RNS zurück, die während dieser 4-stündigen Phase gebildet werden soll.

Der Klärung der Frage, ob in den Prozeß der lichtabhängigen Carotinoidsynthese eine differentielle Genaktivierung eingeschaltet ist, läßt sich – soweit es Versuche mit Hemmstoffen betrifft – im Grunde nur dann näher kommen, wenn zumindest eine annähernd vollständige Hemmwirkung auf die Carotinoidsynthese zu erreichen ist. Eine nur teilweise

Inhibition , wie sie unter anderem Actinomycin D und die Basenanalogen BU und FU erzielen – wobei noch klarzustellen wäre, ob deren Wirkung tatsächlich primär die Nukleinsäuren betrifft – ist für die geplanten Untersuchungen daher nicht hinreichend geeignet. Da also selbst die gebräuchlichsten Antimetabolite nicht zu diesem Ziel geführt haben, mußten sich die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen verstärkt auf den Versuch konzentrieren, eine durch Licht hervorgerufene und im Zusammenhang mit der Induktion der Carotinoidsynthese stehende Veränderung innerhalb der Nukleinsäuren direkt nachzuweisen.

III. Lichtinduzierte Veränderungen innerhalb der Nukleinsäuren

1. Methode

Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Untersuchungen gab es in der Literatur keine Angaben über eine Extraktion der Gesamtnukleinsäuren aus Pilzen; lediglich für *Neurospora crassa* waren drei Methoden ausgearbeitet, die nur auf die Isolierung von DNS ausgerichtet waren (MARMUR, 1961; BRANDT u. DeBUSK, 1964; DUTTA u. RICHMAN, 1966). Es mußte deshalb zunächst ein gangbarer Weg für die Extraktion der Pilznukleinsäuren gefunden werden.

In den ersten Vorversuchen wurde von tiefgefrorenem Mycel ausgegangen, das unter Trockeneis in einer Reibschale aufgeschlossen und anschließend in Puffer suspendiert wurde. Daraus wurden die Nukleinsäuren nach der Phenol-Methode (KIRBY, 1966) in deren Abwandlung durch SCHRAUDOLPH (pers. Mitt.), der Diäthylpyrocarbonat-Methode (FEDORCSAK et al., 1969), der Diäthylpyrocarbonat-SDS- bzw. -SDS-Phenol-Methode (SOLYMOSY et al., 1968) und der Natriumperchlorat-Methode (BRANDT u. DeBUSK, 1964; ODA u. JOKLIK, 1967), sowie der Methode nach PARISH u. KIRBY (1966) extrahiert.

Alle Methoden, auch in den verschiedensten Abwandlungen, brachten bei der nachfolgenden Chromatographie der Nukleinsäuren an MAK (methyliertes Albumin an Kieselgur adsorbiert) keine markanten oder gar reproduzierbaren Elutionsprofile. Offenbar ist die Ribonukleaseaktivität durch die verwendeten Hemmstoffe Bentonit, SDS und DEP nicht vollständig zu unterbinden, sodaß die erhaltene Präparation zum Großteil nur noch aus Bruchstücken besteht.

Entzieht man durch Gefriertrocknung den Zellen das Wasser

vor ihrem Aufschluß, sodaß die Hemmstoffe Bentonit und SDS bei Zugabe des Extraktionsmediums sofort wirksam werden können, so zeigt sich, daß alle bisher angewandten Extraktionsmethoden brauchbare Ergebnisse liefern. Die in den folgenden Abschnitten beschriebene Variante der Phenol-extraktion führte bei allen untersuchten Organismen zu gleich guten Resultaten, sodaß ihr der Vorzug gegeben wurde.

Bei dieser Prozedur führt der durch Adsorption wirkende Hemmstoff Bentonit – ein feingemahlenes Mineral vom Montmorillonit-Typ, das ungereinigt verwendet wurde – zu 20 % Verlusten an RNS (ZELLWEGER u. BRAUN, 1971). Bei der Behandlung mit Phenol gehen 25 % des Puffers und der darin noch gelösten Nukleinsäuren in die Phenolphase über. Der Versuch, die Nukleinsäuren mit CTAB nach HENNIG et al. (1971) zu fällen, führte nur zu geringen Ausbeuten, sodaß die Äthanol-fällung beibehalten wurde.

In allen nachfolgend beschriebenen Versuchen erfolgte die Anzucht von *Fus. oxysporum* wie in Abschnitt I.1. aufgeführt. *Fus. aquaeductuum* wurde in der bei RAU u. ZEHENDER (1959), *Neurospora crassa* in der bei RAU et al. (1963) bereits dargelegten Weise angezogen. Der Versuchsansatz entsprach den in Abschnitt I.3.1.1. geschilderten Arbeitsgängen.

1.1. Extraktion der Nukleinsäuren

Das Mycel (ca. 1,5 g Frischgewicht) wurde über Nacht lyophilisiert, in einer Reibschale unter Trockeneis mit 5 g Seesand (Merck) und 500 mg Bentonit (Serva) 10 Min. zerrieben, in 40 ml Puffer A (0,1 M Tris-HCl, pH 8,4; 0,7 M NaCl; 10 mM EDTA; 2 % SDS; 1 % SAS⁺) suspendiert (25°C), sofort mit demselben Volumen puffergesättigtem Phenol und 1 % Hydroxychinolin versetzt, bei Raumtemperatur 45 Min. gerührt

⁺) SAS soll die Extraktion von m-RNS fördern (BELLAMY, 1966).

und nach Kühlung im Eisbad 5 Min. bei 4°C und 3000 g in swing-out-Bechern zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, mit demselben Volumen puffergesättigtem Phenol mit 1 % Hydroxychinolin und Zusatz von m-Kresol im Verhältnis 50:7 (v/v) wiederum bei Raumtemperatur 20 Min. gerührt, gekühlt, zentrifugiert, den Überstand abpipettiert und mit eiskaltem Chloroform-iso-Amylalkohol 25:1 (v/v) (SEVAG, 1938) 10 Min. zur weiteren Deproteinisierung und zur Entfernung des Phenols kräftig geschüttelt. Nach der Trennung in einem Scheidetrichter wurde die obere wässrige Phase mit 50 ml Äther intensiv geschüttelt, um restliches Phenol auszutreiben. Nach erneuter Phasentrennung erfolgte die Fällung mit zweifachem Volumen 96%igem Äthanol bei -20°C über Nacht. Bei längerem Aufbewahren der Fällung wurden einige Tropfen DEP hinzugefügt. In einigen Fällen trat an die Stelle des Puffers A ein Medium aus 6 % SAS; 1 % Natrium-triisopropylnaphtalensulfonat (Eastman Organic Chemicals); 6 % 2-Butanol; 1 % NaCl. Die Reinheitsprüfung der erhaltenen Nukleinsäuren geschah mit Hilfe des E_{260}/E_{280} -Quotienten, der immer über 2,1 lag.

1.2. MAK-Chromatographie der Nukleinsäuren

Methyliertes Albumin wurde nach MANDELL u. HERSHEY (1960) wie folgt hergestellt: 5 g Rinderserumalbumin (Fraktion V; Fluka) werden in 500 ml Methanol suspendiert und langsam mit 4,2 ml 12 n HCl versetzt. Das Gemisch verbleibt unter gelegentlichem Schütteln drei Tage im Dunkeln. Das Präzipitat wird durch Zentrifugation gesammelt und je zweimal mit Methanol und wasserfreiem Diäthyläther gewaschen. Das Pulver wird im Exsikkator über KOH aufbewahrt.

Die Säulenchromatographische Trennung der Nukleinsäuren geschah in einer Modifikation der Methode von MANDELL u. HERSHEY (1960) nach SCHRAUDOLPH (pers. Mitt.). Ausreichend zur Füllung einer Säule wurden 15 g Hyflo-Super-Cel

(Serva) in 75 ml 50 mM Phosphatpuffer, pH 6,7 mit 0,4 M NaCl kurz aufgeköcht und nach dem Abkühlen mit 37,5 mg methyliertem Albumin in 1%iger Lösung versetzt; die Adsorption des Esters dauerte unter mehrmaligem Schütteln 3 Std.

Zum Schutz der Glasfritte (G4) wurde die Säule, die ständig auf einer Temperatur von 30°C gehalten wurde, zunächst ca. 1 mm hoch mit einer Aufschlämmung von Zellulose (Macherey u. Nagel, MN 2 100) gefüllt, sodann die MAK-Suspension in 5-ml-Portionen aufgebracht. Die Säule wurde dann mit je 30 ml 50 mM Phosphatpuffer, pH 6,7 mit 0,4 M NaCl bzw. 0,25 M NaCl von UV-absorbierendem Material befreit.

Die gefällten Nukleinsäuren wurden 5 Min. bei 2000g zentrifugiert, kurz getrocknet und in 5 ml SSC-Puffer (15 mM Nacitrat; 150 mM NaCl; pH 6,7), in späteren Versuchen direkt in 50 mM Phosphatpuffer, pH 6,7 mit 0,25 M NaCl (Startpuffer), aufgenommen. 50 μ l dieser Lösung wurden auf 2 ml aufgefüllt und ihre Absorption bei 260 nm gemessen. Die aufzutragende Menge war gegeben, wenn aus dieser Verdünnung eine Extinktion von 0,45 resultierte.

Nach dem Auftragen der Nukleinsäuren wurde die Säule mit 20 ml Startpuffer gewaschen und sodann mit einem linearen Gradienten von 0,375 - 1,375 M NaCl in 50 mM Phosphatpuffer, pH 6,7, eluiert. Die Gradientenherstellung erfolgte in einem neunkammerigen Mischer (Boskamp Variograd) mit jeweils um 0,125 ansteigender Kochsalzmolarität. Die Säule wurde unter dem Druck einer Perpex-Pumpe (LKB; 80 ml/h) entwickelt und gleichzeitig die Absorption bei 254 nm gemessen. Fraktionen von 2 ml wurden aufgefangen (LKB Uvicord II mit Fallbügel-schreiber und Fraktionskollektor). Nach Durchlauf der letzten Fraktionen wurde die Säule mit 1 M NH_4OH bzw. 2 M NaOH oder 0,1 % SDS gewaschen und das Eluat ebenfalls aufgefangen.

1.3. Chromatographie auf BPAK-Säulen

LOESER et al. wiesen 1970 einen neuen Weg zur säulenchromatographischen Trennung von RNS: Kieselgursäulen, die mit einer der folgenden Polyamino-säuren beschichtet waren: Poly-L-Lysin, Poly-L-Arginin und Poly-L-Ornithin. Die Poly-L-Lysin-beschichtete Kieselgursäule (PLK) wurde bereits früher für die Auftrennung von DNS verwendet (Lit. siehe KOTHARI et al., 1972).

Für unsere Versuche wurden die Säulen nach JARVIS et al. (1970) wie folgt bereitet: Eine Suspension von 8 g Hyflo-Super-Cel wurde in 60 ml Startpuffer (150 mM Phosphatpuffer, pH 6,7; 500 mM NaCl) kurz aufgekocht, um Luftblasen auszutreiben. Die Menge war für eine Säule 1,5 x 13 cm ausreichend. Von den Polyamino-säuren wurden 6 mg in 3 ml Wasser gelöst und mit der abgekühlten Suspension vereinigt. Zur Füllung der Säule wurde wie bei der MAK-Säule verfahren. Eine Aufschlammung von 2 g luftblasenfreiem Hyflo-Super-Cel in 10 ml Startpuffer wurde darübergeschichtet und die Säule mit 50 ml Startpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte bei 30°C in Abänderung der Angaben von JARVIS mit einem linearen Gradienten von 0,5 - 3,0 M NaCl in 150 mM Phosphatpuffer, pH 6,7, mit einer Durchflußrate von 80 ml/h. Fraktionen von 2 ml wurden gesammelt.

1.4. Radioaktivitätsmessung im Säuleneluat

Das Säuleneluat aus MAK und BPAK mischt sich weder mit Bray' solution noch mit einem anderen gängigen Szintillationsgemisch auf Dioxanbasis. Die oft nur geringen Aktivitäten erfordern ein möglichst großes Aliquot zur Messung. Da auch der Lösungsvermittler BBS-3 (Deckman) in Toluol nur 350 mM Salz toleriert, mußten die Nukleinsäuren aus den Fraktionen gefällt werden.

Die Fällung erfolgte mit 10%iger TCA im Eisbad nach vorheriger Zugabe von 200 µg RNS (aus Hefe; Boehringer) als carrier. Nach 30 Min. wurde das Präzipitat auf Membranfilter (Sartorius, SM 113 06, Ø 24 mm) abgenutscht, bei 40°C getrocknet und in Toluol-PPO (5 g PPO/Liter Toluol) gemessen. In späteren Versuchen wurde das mit carrier versetzte Eluat bei Raumtemperatur mit 1 % CTAB gefällt, auf Whatman GF/C abfiltriert, getrocknet und in Toluol-butyl-PBD (7 g butyl-PBD/Liter Toluol) gemessen. In jedem Fall wurde im Szintillationszähler (Beckman LS 100, später im Betaszint BF 5000) auf 2 % Fehler gezählt.

Bei Doppelmarkierungsversuchen (siehe Abschnitt III.2.1.) – Einsatz der Nuklide ^3H und ^{14}C in äquimolaren Mengen bei der belichteten Probe (L) und der Dunkelkontrolle (D); reziproker Ansatz zur Kontrolle meßtechnisch bedingter Unterschiede zwischen L und D – erfolgte eine Quenchkorrektur insoweit, als die Diskriminatoreinstellung am Szintillationszähler so gewählt wurde, daß der over-spill auf 1 % ^3H im ^{14}C -Kanal und 3 % ^{14}C im ^3H -Kanal begrenzt war.

1.5. Auftrennung mittels Disk-Elektrophorese

In der Literatur waren mehrere Methoden zur elektrophoretischen Trennung von Nukleinsäuren zu finden, die sich vornehmlich in der Zusammensetzung der Gele und im verwendeten Puffer unterschieden. Zunächst wurde die von SEITZ u. RICHTER (1970) beschriebene Elektrophorese auf 2,1%igen Acrylamidgelen versucht; als Puffersystem fand der TBE-Puffer (90 mM Tris; 90 mM Borsaure; 25 mM EDTA; pH 8,3 ohne Justierung) Verwendung (RUPPEL, 1968). Die Trennung war jedoch nicht zufriedenstellend.

Gute Ergebnisse brachte die Elektrophorese nach LOENING (1967). Der von FORRESTER (1970) mit diesem Gelsystem verwendete Mg-Puffer (30 mM Tris-HCl, pH 8,1; 0,1 mM EDTA; 2 mM Mg-acetat) war hier aber nicht dafür geeignet. Das

Arbeiten mit dem sehr weichen 2,1%igen Gel bereitete allerdings Schwierigkeiten. Ohne feststellbare Veränderungen im Trennverhalten konnte durch Steigerung der Konzentration auf 2,4 % und Zusatz von 0,5 % Agarose (Serva) die Manipulierbarkeit der Gele stark verbessert werden.

1.5.1. Nachreinigung der Nukleinsäuren

Für die Elektrophorese war eine Nachreinigung der mit Äthanol gefällten Nukleinsäuren angeraten. Nachdem die Umfällung nach BELLAMY u. RALPH (1968) nicht zum gewünschten Erfolg führte, wurde die Reinigung mittels Chromatographie auf Sephadex durchgeführt (TRUMAN u. FREDERIKSEN, 1969):

Die gefällten Nukleinsäuren wurden 5 Min. bei 2000 g zentrifugiert, in 0,5 ml 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,2, aufgenommen und auf eine Sephadex-G-25-Säule (2 x 22 cm) aufgetragen. Die Elution erfolgte bei Raumtemperatur mit demselben Puffer bei einer Durchflußrate von 40 ml/h. Die hochmolekulare RNS, die mit der Pufferfront läuft, wurde gesammelt, mit 0,1-fachen Volumen 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5,1; 140 mM NaCl; 1 mM $MgCl_2$ versetzt und mit dem dreifachen Volumen Äthanol gefällt.

Die wiederum abzentrifugierten Nukleinsäuren wurden in einem definierten Volumen 1xE-Puffer gelöst, 20 μ l daraus entnommen, auf 2 ml aufgefüllt und die Absorption bei 260 nm gemessen. Die Stammlösung wurde soweit verdünnt, daß sich dabei eine Extinktion von 0,2 ergab.

1.5.2. Elektrophoreseverlauf

Zur Bereitung der Gele wurde die von VEDEL u. D'AOUST (1970) stammende Modifikation der Technik von LOENING (1967) mit der Angabe zur Herstellung agarosehaltiger Gele (PEACOCK u. DINGMAN, 1968) wie folgt kombiniert:

Acrylamid (Serva) wurde nach LOENING in Chloroform, N,N'-Methylenbisacrylamid in Aceton umkristallisiert. Für 10 Gele (0,6 x 8 cm) werden folgende Bestandteile gemischt:

19% Acrylamid, 1 % N,N'-Methylenbisacrylamid in H ₂ O	3,6 ml
3xE-Puffer (120 mM Tris-acetat, pH 7,8; 60 mM Natrium-acetat; 3 mM EDTA)	10,0 ml
TMED (N,N,N',N'-Tetramethyäthylendiamin)	0,02 ml
10 % Ammoniumpersulfat (frische Lösung)	0,2 ml

Sofort nach Zugabe des Ammoniumpersulfats wurde der raumtemperierte Ansatz mit

0,15 g Agarose, gelöst in	16,18 ml
---------------------------	----------

Wasser, abgekühlt auf etwa 35°C, gemischt, in die Rührchen gegossen und rasch mit 1xE-Puffer überschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von 30 Min. wurde der über dem Gel verfestigte Teil der Agarose mit einem Spatel abgelöst und eine ebene Geloberfläche geschaffen.

Als Kammerpuffer diente 1xE-Puffer mit 0,1 % SPS. Alle Arbeiten wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Gele wurden nach einer Prä-Elektrophorese von 30 Min. Dauer bei 5 mA pro Gel zum Versuch verwendet. Nach Zusatz von 10 % Saccharose (RNasefrei; Serva) und 0,001 % Pyronin G (Merck) als Marker konnte die nachgereinigte Nukleinsäurelösung durch Unterschichten auf die Gelrührchen aufgetragen werden. Nach einer Eindringzeit von 15 Min. bei 2 mA/Gel wurde die Stromstärke für die elektrophoretische Trennung auf 5 mA/Gel erhöht.

1.5.3. Färbung

Sobald die Pyroninbande am anodischen Ende angelangt war, wurden die Gele mit einer Sonde in einem S.S-haltigen Wasser-

bad von der Röhrchenwand abgelöst. Nach fünfminütiger Fixierung in 1 M Essigsäure wurde 10 Min. in 2 % Methylenblau, das in 0,4 M Acetatpuffer, pH 4,7, gelöst war, gefärbt und ca. 48 Std. gegen dest. Wasser differenziert (RUPPEL, 1968). Bei neueren Versuchen wurde Methylenblau durch 0,02 % Azur B ersetzt; die Färbezeit betrug dabei 2 Std., die Entfärbung erfolgte über Nacht. Gegenüber der in der Literatur beschriebenen rein wässrigen Lösung von Azur B bietet die acetatgepufferte Lösung den Vorteil einer stärkeren Bindung des Farbstoffs an die Nukleinsäuren und einer rascheren und schärferen Differenzierung.

Neben Methylenblau und Azur B wurden folgende Farbstoffe auf ihre Verwendbarkeit geprüft:

Methylgrün (chloroformgewaschen zur Entfernung von Methylviolet), 0,025%ig in Acetatpuffer, pH 4,7;

Pyronin G, 0,025%ig;

Methylgrün-Pyronin G (BRACHET, 1960);

Gallocyanin-Chromalaun (GROSSBACH, 1968);

Wegen zu geringer oder unbeständiger Färbung wurden sie jedoch nicht verwendet.

1.5.4. Autoradiographie

Die Autoradiographie von Polyacrylamidgelen war bislang, verursacht durch das Schrumpfen der Gele während des Trocknungsvorganges, nur bedingt möglich. Es wurde deshalb versucht, mit einfachen Mitteln eine erhöhte Ausbeute verwendungsfähiger Gele zu erzielen. In Abwandlung und Kombination einiger bekannter Methoden wurden hierzu säurebeständiges Hart-PVC und Zellophan verwendet.

Zunächst wurde das in TCA oder Essigsäure aufbewahrte Gel durch einen einfachen Längsschnitt zerteilt (Mehrfachschnitte sind ebenso verwendbar) und anschließend 1-2 Std. gewässert, um den Großteil der Säure zu entfernen. Mit seiner Schnitt-

fläche wurde es sodann luftblasenfrei auf einen PVC-Block gleicher Breite aufgebracht, der etwa 1,5 cm hoch und länger als das Gel war; die Kanten des Blocks waren etwa 0,5 mm breit gebrochen. Die Lagefixierung des Gels erfolgte durch zweifaches blasenfreies Umwickeln mit durchfeuchtetem Zellophan in seiner Dehnungsrichtung. Das Zellophan wurde durch Klammern festgehalten und das Gel so über Nacht getrocknet. Bei den weicheren Gelen mit Acrylamidkonzentrationen unter 7,5 % war es notwendig, ein seitliches Ausweichen des Gels im Verlauf der Trocknung dadurch zu verhindern, daß nach der Wicklung auf beiden Seiten je ein weiterer PVC-Block aufgeklebt wurde, die dann in Abständen von etwa einer halben Stunde jeweils für einige Minuten entfernt wurden, um ein Nachtrocknen der Zellophanseitenflächen zu gestatten.

Das nun als steifer Streifen vorliegende Gel ließ sich leicht von der Unterlage ablösen, wurde von dem umgebenden Zellophan befreit und, da es die Neigung hat, sich unter wechselnder Luftfeuchtigkeit zu krümmen, mit seiner Rückseite auf eine verwindungsfreie Unterlage (geeigneter Karton o. ä.) aufgeklebt und auf Röntgenfilm (Agfa-Gevaert CURIX p RP oder Kodak NO-SCREEN medical film) exponiert.

1.5.5. Densitometrie

Die Absorption der auf optimalen Kontrast ausdifferenzier-ten Banden der gefärbten Gele wurde im Durchlichtdensitometer (Vernon oder Vitatron TLD 100) bei gelb gefiltertem Licht gemessen. Die Schreibervorschubgeschwindigkeit betrug jeweils das Doppelte des Gelvorschubs.

Die in Agfa "8-66" entwickelten Röntgenfilme wurden ohne Filterung densitometrisch ausgewertet. Die sich für jedes Gel so ergebenden Kurven aus beiden Auswertungen konnten einander direkt zugeordnet werden.

1.6. Isolierung von Polysomen

Für die Isolierung intakter Polysomen dienten die Methoden nach GIELKENS et al. (1971), LEE et al. (1971) und SCHWARTZ (1971) als Grundlage. In ausgedehnten Vorversuchen nach Abwägung der Aufschlußmethode, des Extraktionsmediums und der selektiven Gewinnung hat sich die nachstehend beschriebene Methode als diejenige erwiesen, die eine hohe Ausbeute an Polysomen bei gleichzeitig geringem Anteil an Monosomen und Untereinheiten erbrachte:

Etwa 24 Std. altes Mycel (ca. 1 g Frischgewicht) wurde in der Reibschale mit 5 g Seesand (Merck) und 2 ml TDKM-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,5; 30 mM KCl; 3 mM Mg-acetat; 1 mM Dithiothreitol; 0,2 mM CHCl₃; 10 % Saccharose; 0,5 % Brij 58; 0,5 % DOC und 30 µg/ml DNase I (RNasefrei; Sigma) zerrieben, mit 8 ml Puffer verdünnt und 15 Min. bei 14 000 g_{AV} zentrifugiert. Das polysomenhaltige Sediment wurde zweimal mit 1 ml Puffer PS (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 80 mM KCl; 5 mM Mg-acetat) gewaschen, in 1,5 ml desselben Puffers aufgenommen, auf einen linearen Gradienten von 15 - 30 % Saccharose (RNasefrei; Serva) in Puffer PS aufgetragen und 3 Std. bei 26 000 rpm im Spinco SW 27-Rotor aufgetrennt.

Diese Präparation war aber durch radioaktives, nicht UV-absorbierendes Material verunreinigt. Eine sauberere Polysomenfraktion konnte erhalten werden, wenn der Extrakt nur mit 1 ml TDKM-Puffer verdünnt und der 14 000 g-Überstand auf einen Stufengradienten (3 ml 1,5 M Saccharose in Puffer PS) aufgebracht und im Winkelrotor 3 Std. bei 170 000 g_{AV} zentrifugiert wurde. Das Sediment wurde entweder ebenfalls einer Gradientenzentrifugation unterzogen oder aber für die Lisk-Elektrophorese der enthaltenen Nukleinsäuren mit Phenol nach der in Abschnitt III.1.1. beschriebenen Methode extrahiert.

nach der Gradientenzentrifugation wurden die Nitrozellulosebecher am Grund mit einer Kanüle angestochen, der Inhalt abgepumpt und über einen LKB Uvicord II die Absorption bei 254 nm gemessen. Es wurden 1 ml-Fraktionen aufgefangen und mit Toluol-Triton X-100 (2:1) mit 0,7 % butyl-PBD bei entsprechend korrigierter Diskriminatoreinstellung (siehe Abschnitt III.1.4.) im Szintillationszähler (Betaszint BF 5000) gemessen.

1.7. Affinitätschromatographie auf Nitrozellulosefiltern

Die Erfassung adeninsequenzhaltiger RNS geschah im wesentlichen nach der Methode von BRAWERMAN et al. (1972). Die Gesamtnukleinsäuren wurden in der bereits beschriebenen Weise gewonnen (Abschnitt III.1.1.), jedoch trat an die Stelle des Puffers A ein Medium mit 6 % Natrium-4-aminosalicylat; 1 % Natrium-triisopropyl-naphtalensulfonat (Eastman Organic Chemicals); 6 % 2-Butanol und 1 % NaCl. Außerdem wurde die Phenolphase einmal re-extrahiert. Die in Puffer N (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,5 M KCl; 1 mM $MgCl_2$) aufgenommenen Nukleinsäuren wurden nun zunächst zur Klärung der Lösung 2 Std. bei 170 000 g_{AV} zentrifugiert, mit demselben Puffer auf eine Konzentration von etwa 0,2 mg/ml gebracht und langsam durch die mit 20 ml Puffer N vorgewaschenen Nitrozellulosefilter hindurchtropfen lassen (Schleicher & Schüll RA 85, $\varnothing$ 24 mm; zur Entfernung der Luft aus den Poren waren sie bereits über Nacht in Puffer N verbracht worden). Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,5 ml pro Min. Die Filter wurden mit 25 ml Puffer N nachgewaschen, sodann, um die von der Fritte umschlossenen Filterränder zu spülen, in demselben Puffer etwa 1 Min. geschwenkt, getrocknet und die Radioaktivität in Toluol-butyl-PBD im Szintillationszähler gezählt.

2. Ergebnisse

2.1. MAK-Chromatographie

Eine der ersten säulenchromatographischen Methoden, die eine reproduzierbare Fraktionierung von RNS lieferten, war die MAK-Säule. Eine Celite-Säule, überzogen mit methyliertem Rinderserumalbumin, wurde 1955 von LERMAN als Anionenaustauscher für die Auftrennung von DNS eingeführt und nachfolgend von MANDELL u. HERSHEY (1960) für RNS ausgearbeitet. Die Säule ist in der Lage, verschiedene RNS-Spezies auf der Basis ihrer Konfiguration und Basenzusammensetzung scharf zu trennen. Zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Untersuchung war die MAK-Säule das Hauptwerkzeug aller, die mit einer Auftrennung von Nukleinsäuren beschäftigt waren.

Die in Abschnitt III.1.2. beschriebene Prozedur für die Trennung von Nukleinsäuren aus *Fus. oxysporum*, *Fus. aqueductum* und *Neurospora crassa* ergab reproduzierbare und befriedigende Ergebnisse; in Abb. 5 ist ein typisches Elutionsprofil der MAK-Säule dargestellt. Die scharfe Abgrenzung zwischen s-RNS, DNS und r-RNS wird daraus deutlich. Die Gleichförmigkeit der Elutionsprofile aller drei Organismen und die Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei anderen Objekten, auch bei *Euglena gracilis* (DITTES u. MOHR, 1970), wo sich l-rRNS und h-rRNS nicht in der gewohnten Weise auftrennen (Abb. 6), deutet auf eine universelle Verwendbarkeit der hier erarbeiteten Extraktionsmethode hin.

Schnell markierte RNS – oft gleichgesetzt mit m-RNS – wurde bislang an der hochmolekularen Schulter der h-rRNS gesucht und, zumindest in einigen Fällen wie bei der Sojabohne (KEY u. INGLE, 1964) und bei Erdnußkotyledonen (CHROBOZCEK u. CHERRY, 1965) auch gefunden. Um welche RNS-Spezies es sich dabei tatsächlich handelte blieb aber bis heute unklar, obwohl die Ermittlung der Basenzusammensetzung dieser Fraktionen das erwartete Verhältnis einer adeninreichen Nuklein-

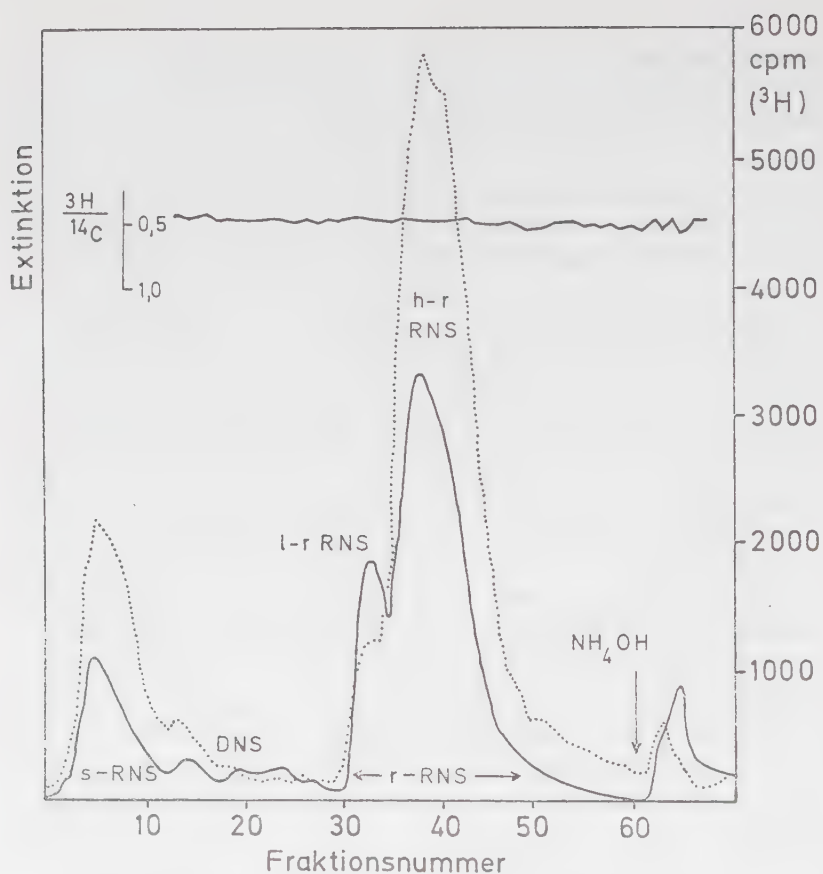


Abb. 5: MAK-Chromatographie der Gesamtnukleinsäuren aus *Fus. oxysporum*. Markierung der 10 Min. vorbelichteten Zellen mit 0,2 uCi/ml U- ^{14}C -Uridin für weitere 30 Min. Belichtung und der Dunkelkontrolle mit 0,8 uCi pro ml G- 3H -Uridin. — UV-Absorption; ... Radioaktivität.

säure ergab, und damit eines der Kriterien, die eine m-RNS auszeichnen, erfüllt war. Liegt nun in der Zelle die m-RNS nur in einem Anteil von ca. 1 % vor, wie vielfach wohl zurecht angenommen wird, so kann sich aufgrund einer zusätz-

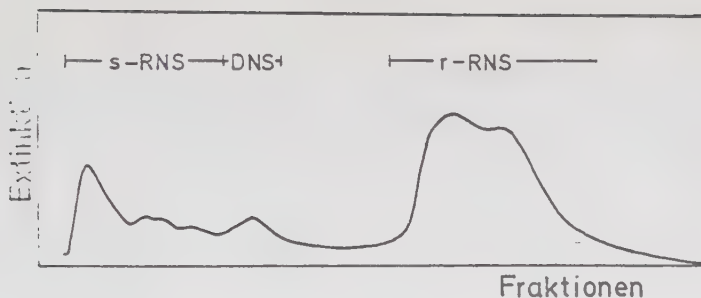


Abb. 6: MAK-Chromatographie der Gesamtnukleinsäuren aus *Euglena gracilis*. — UV-Absorption.

lichen Aktivierung von nur wenigen Genen im UV-Elutionsprofil der belichteten Probe ein Anstieg im m-RNS-Gehalt nicht bemerkbar machen, da er von der Menge der h-rRNS überdeckt wird. Bei der Photoinduktion von *Fus. oxysporum*, *Fus. aquaeductuum* und *Neurospora crassa*, in denen das Licht außer der Auslösung der Carotinoidsynthese wohl keinen zusätzlichen Effekt hervorruft, sollte aber unter "step-down"-Bedingungen, wobei der Pilz in ein Minimalmedium (Puffer + Glucose) überführt wird, nur der neu gebildete "messenger" für die Carotinoidsynthese schnell markiert sein und als radioaktiver Peak über das UV-Absorptionsprofil der h-rRNS hinausragen.

Für die Versuche wurde Pilzmycel bei Gabe von ^{14}C -Uridin belichtet. Die Dunkelkontrolle erhielt ^3H -Uridin während derselben Zeit. Um mögliche methodisch bedingte Fehler zu erkennen, wurden die Versuche jeweils reziprok angesetzt, d. h. ^3H -Uridin für die belichtete Probe, ^{14}C -Uridin für die Kontrolle. Beide Proben wurden nach der Gefriertrocknung vereinigt und zusammen aufgearbeitet. Wie aus Abb. 5 hervorgeht ist trotzdem in solchen Doppelmarkierungsversuchen, die Meßfehler durch unterschiedliche Elution der Probe und der Kontrolle auf der Säule ausschließen, die Koinzidenz der UV-Absorptionskurve und der Radioaktivitätskurven der beiden Nuklide über den gesamten Elutionsbereich gewahrt.

Unter "step-down"-Bedingungen könnte man erwarten, daß die vorhandenen Ribosomen ausreichen, um den Erhaltungsstoffwechsel zu gewährleisten, und daher keine neue r-RNS synthetisiert werden muß. Daß dies aber nicht der Fall ist, zeigt der Befund, daß zwischen den bis zu 24 Std. verarmten Zellen (Minimalmedium) und solchen, die bis zu ihrer Überführung in das Inkubations- bzw. Belichtungsmedium (ebenfalls Puffer + Glucose) im Vollmedium gehalten wurden, nie ein Unterschied in der Markierung der r-RNS festgestellt werden konnte.

So mußte versucht werden, durch Variation von Markierungsdauer und -zeitpunkt, sowie Belichtungsdauer und Lichtintensität das Optimum der eventuellen m-RNS-Produktion zu erfassen, um so eine differentielle Synthese sichtbar machen zu können.

Bei *Fus. oxysporum* und *Fus. aquaeductuum* ist bekanntlich im Gegensatz zu *Neurospora crassa* keine Sättigung der Lichtreaktion zu erzielen (siehe Abschnitt I.3.3.). Beide Organismen sind also für längere Markierungs- und Belichtungszeiten geeignet. Eine Induktionsdauer bis zu 15 Std. veränderte aber ebensowenig die Markierungsverhältnisse wie eine 15-minütige Inkubation. Um mit einer möglichst hohen Lichtintensität zu bestrahlen wurde im Sonnenlicht im Bereich von 90 000 - 120 000 Lux gearbeitet. Zur Verminderung der gegenseitigen Beschattung der Hyphen erfolgte die Belichtung von *Fus. aquaed.* in Reagenzgläsern. Bei Expositionszeiten von mehr als 40 Min. trat eine deutliche Schädigung des Pilzes ein, die sich zuerst in einer verminderten Farbstoffsynthese bemerkbar machte, bis es schließlich bei 4-stündiger Belichtung zur völligen Unterbindung der Carotinoidsynthese kam. Es handelt sich dabei aber nicht um einen Blendungseffekt ähnlich dem bei *Phycomyces blakesleeana* (Lit. siehe BERGMAN et al., 1969); dies zeigte der minimale Einbau von Radioaktivem Uridin in die RNS. Welcher Natur die Ursache dieser Hemmung ist,

konnte nicht geklärt werden. Der Effekt trat kaum auf, wenn die Belichtung in dickwandigen Gaswaschflaschen erfolgte. Die Dicke des Glases und dessen Qualität scheint neben der Schichtdicke des Mycels eine Rolle zu spielen. Eine Wirkung des UV-Anteils des Tageslichts scheint ausgeschlossen, da eine Belichtung mit einer UV-Sterilisationslampe zu kräftiger Pigmentsynthese führt. Die Wärmewirksamkeit der IR-Strahlung wurde andererseits durch entsprechende Kühlung verhindert und das Mycel bei konstanter Temperatur von 22°C gehalten.

Die Ergebnisse aller mit verschiedenen Variationen von Belichtung und Markierung durchgeführten Versuche erbrachten keinen Unterschied im Markierungsmuster von belichtetem und unbelichtetem Pilzmycel. Auf ELLEM u. SHERIDAN (1964) geht die Beobachtung zurück, daß nicht das gesamte an MAK adsorbierte Material durch einen NaCl-Gradienten eluiert wird; es bleibt ein relativ fest gebundener Rest, die sogenannte "tenaciously bound RNA", kurz TB-RNS, auf der Säule zurück. Mit Alkali (1 M NH_4OH , 2 M NaOH) oder Detergentien (0,1 % SDS) oder auch durch Elution bei erhöhter Temperatur (95°C) gelingt die Freisetzung dieser RNS-Komponente. ELLEM hat sie 1966 auch als "DNA-like RNA" bezeichnet, da sie wegen ihres Adenin-Reichtums ebenso wie die schnell markierte RNS der DNS ähnelt. Vielfach wurde in ihr auch die m-RNS gesehen (JOHNSON, 1970). Demnach sollte eine durch Belichtung bedingte erhöhte Markierung in den nachträglich mit NH_4OH eluierten Fraktionen zu finden sein; ein Hinweis dafür war aber in keinem Versuch (siehe auch Abb. 5) zu erkennen.

2.2. BPAK-Chromatographie

Die Poly-L-Argininsäule (PAK) schien für unsere Zwecke ungeeignet, sodaß wir uns auf die Poly-L-Lysin- (PLK) und Poly-L-Ornithinsäule (POK; Träger jeweils Kieselgur) beschränkten.

JARVIS et al. (1970) fordern zur Elution für die PLK-Säule zusätzlich zum 0,1 - 1,6 M NaCl-Gradienten einen pH-Gradienten; damit wurden aber keine befriedigenden Ergebnisse erzielt. Mit dem auch bei der POK-Säule verwendeten Gradienten von 0,5 - 3,0 M NaCl wurde ein markantes Elutionsprofil erhalten. Diesen Befund bestätigen indirekt auch BLAMIRE et al. (1972b), die einen Gradienten von 0,4 - 4,0 M NaCl einsetzen.

Wie die Abb. 7 zeigt sind die Elutionsprofile von PLK- und POK-Säulen nicht grundlegend von denen der MAK-Säule verschieden. Vor allem im Bereich der r-RNS scheint das Auflösungsvermögen der BPAK geringfügig größer zu sein. Leider brachten

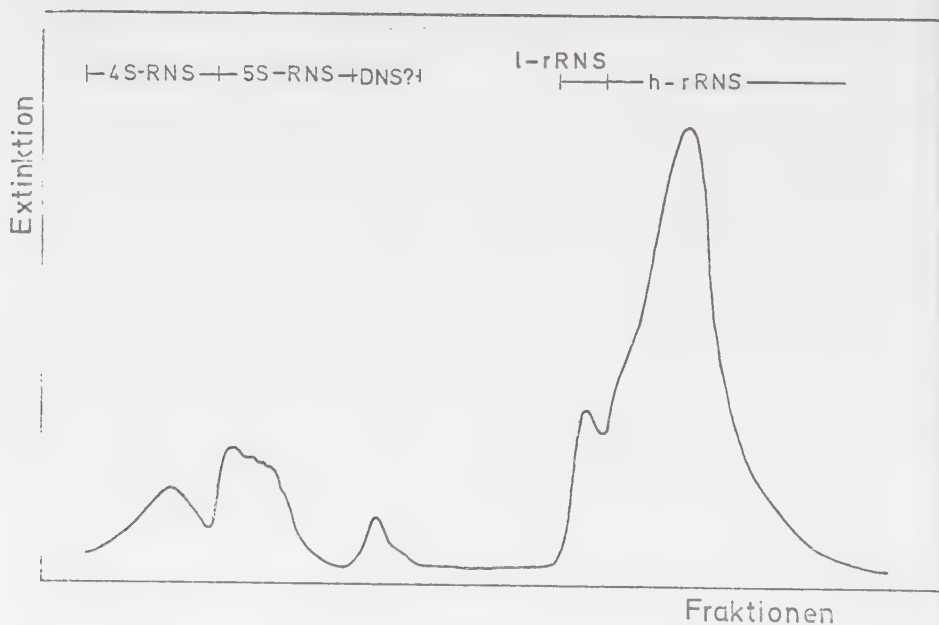


Abb. 7: PLK-Chromatographie der Gesamtnukleinsäuren aus *Fus. aquaeductum*. — UV-Absorption.

aber auch die mit BPAK-Säulen durchgeführten Versuche keine Annäherung an eine Lösung der anstehenden Probleme.

2.3. Lichtinduktion unter Cycloheximid

Wenn man bei der Annahme bleibt, daß die lichtinduzierte Carotinoidsynthese über eine differentielle Genaktivierung realisiert wird, muß aus den bisherigen Versuchsergebnissen geschlossen werden, daß die Menge der gebildeten m-RNS so gering ist, daß sie nur erfaßt werden kann, wenn man ihren Anteil an der Gesamt-RNS auf irgend eine Weise vergrößert – also m-RNS anreichert – oder aber indem man eine Trennungsmethode findet, die die m-RNS völlig separiert.

Aufgrund des von HARDING u. MITCHELL (1968) und RAU (1971) beschriebenen Gedächtnisphänomens bei *Neurospora crassa* und *Fus. aquaeductuum* bestand eine Möglichkeit m-RNS in der Zelle anzuhäufen, wenn man postuliert, daß das hypothetische "Induktionsprodukt" m-RNS ist. RAU hatte zeigen können, daß beide Organismen nach Blockierung der Proteinsynthese durch Zugabe von Cycloheximid (CHI) vor der Belichtung und Beseitigung des Blocks durch Auswaschen im Dunkeln bis zu 30 Std. danach (bei *Neurospora crassa* bis zu 14 Std.) in der Lage sind, ohne erneute Lichtinduktion, allerdings mit deutlich verlängerter lag-Phase, Carotinoide zu bilden. Durch eine längere Belichtung unter CHI könnte es demnach gelingen, das "Induktionsprodukt" – m-RNS – zu akkumulieren, weil durch die Verhinderung seiner Weiterverarbeitung offensichtlich kein oder nur wenig Abbau stattfindet.

Die Versuche wurden dazu folgendermaßen angesetzt: Bereits 15 Min. vor Beginn der Belichtung wurde das verarmte Mycel mit CHI versetzt, das nach bisherigen Befunden in der Zelle sehr rasch wirksam wird. Nach einer 4-stündigen Belichtung wurde das Mycel unverzüglich tiefgefroren und der Gefrier-trocknung zugeführt. Die Kontrolle verblieb bei sonst

gleichen Bedingungen im Dauerdunkel. Werden die aus einem so behandelten Mycel extrahierten Nukleinsäuren mit den bisher verwendeten chromatographischen Methoden aufgetrennt, so erhält man gegenüber den nicht unter CHI belichteten Zellen Unterschiede im Bereich der r-RNS. An der hochmole-

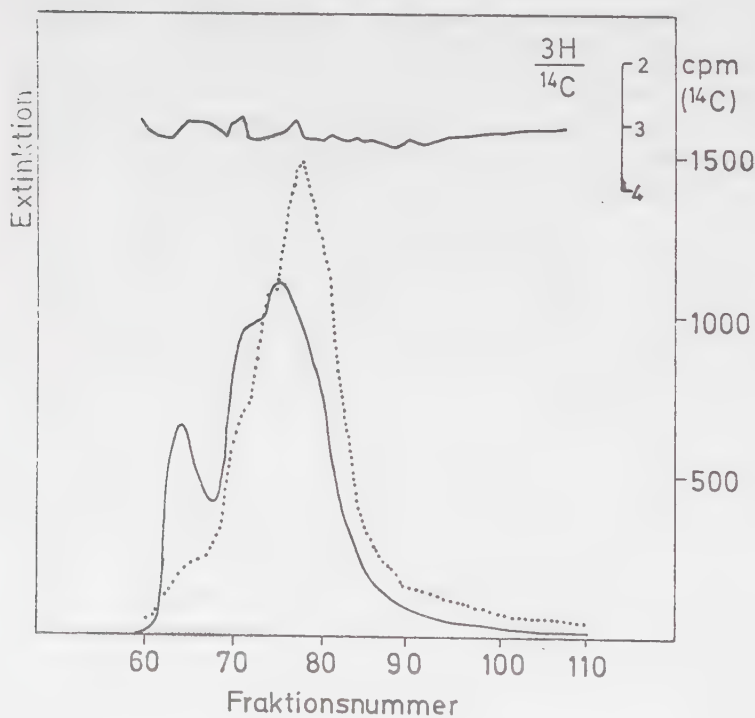


Abb. 8: MAK-Chromatographie von r-RNS aus *Fus. aquaeductuum* nach 4-stündiger Belichtung unter CHI. Markierung der belichteten Probe mit 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$ $\text{U-}^{14}\text{C}$ -Uridin, der Dunkelkontrolle mit 0,8 $\mu\text{Ci/ml}$ $\text{G-}^3\text{H}$ -Uridin unter Zusatz von je 30 mM kaltem Uridin.
 — UV-Absorption; ... Radioaktivität.

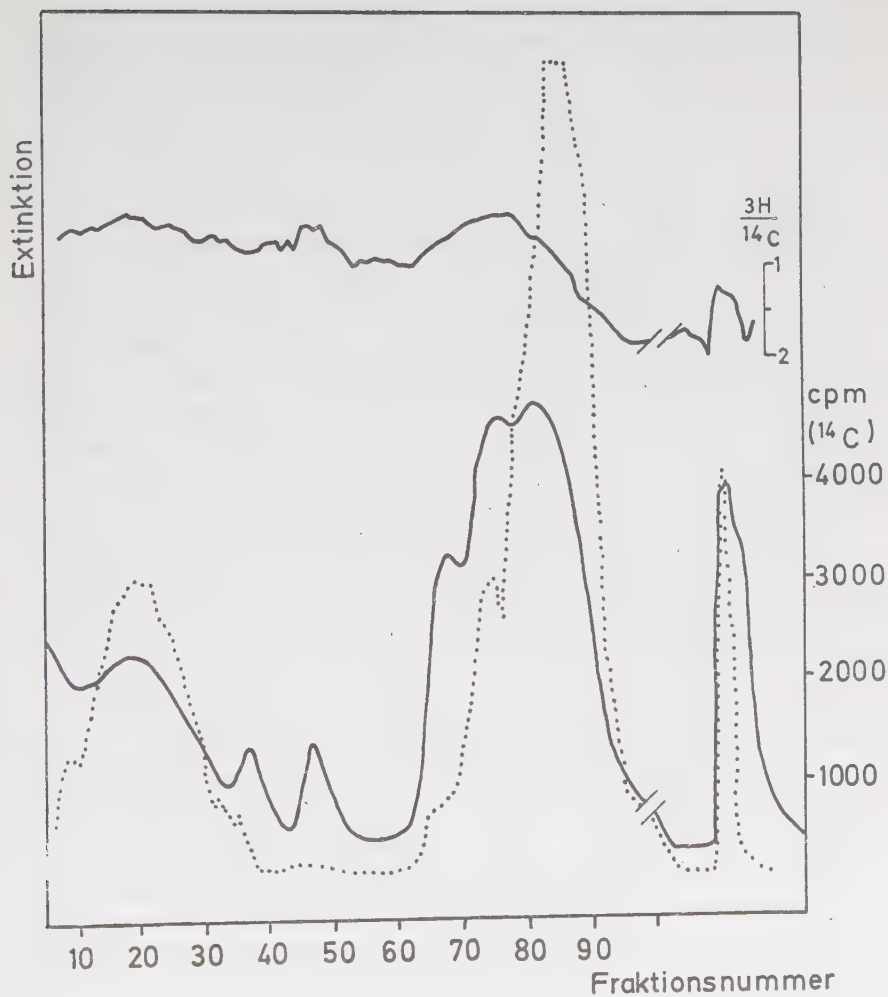


Abb. 9: MAK-Chromatographie der Gesamtnukleinsäuren aus *Neurospora crassa*. Versuchsbedingungen wie Abb. 8.



kularen Schuler der h-rRNS wird im MAK-Profil ein zusätzlicher Gipfel erkennbar, der im Verhältnis stark markiert ist (Abb. 8 u. 9; zum Vergleich siehe Abb. 5). Vornehmlich aus den Elutionsprofilen der BPAK-Säulen wird deutlich, daß sich die Radioaktivität auf den hochmolekularen Teil des r-RNS-Bereichs beschränkt, während vor allem die l-rRNS nur gering markiert ist (Abb. 10). Unter dem Einfluß von CHI wird also eine bestimmte RNS-Spezies angehäuft; andererseits ist aber eine Differenz zwischen lichtinduzierter und unbelichteter Probe wiederum nicht feststellbar: das Verhältnis zwischen den Nukliden ^3H und ^{14}C ist im Säuleneulat in keiner der Fraktionen signifikant verändert.

Abb. 10: PLK-Chromatographie von r-RNS aus *Fus. aquaeductuum*. Versuchsbedingungen wie Abb. 8.

Um einen durch Licht gesteigerten Einbau der Nukleoside in eine definierte RNS nachzuweisen, mußte nun also versucht werden, diese besser zu separieren.

2.4. Disk-Elektrophorese der Nukleinsäuren

Im Gegensatz zu ihrem Verhalten in den säulenchromatographischen Verfahren ist die r-RNS nach der Elektrophorese vollständig in ihre beiden Hauptkomponenten getrennt. Unter Bezugnahme auf die in der Literatur vorliegenden Werte für die r-RNS von Pilzen (LOVETT u. HASELBY, 1971) können sie als 18 S und 25 S-RNS beschrieben werden und entsprechen somit in ihrem Sedimentationsverhalten der r-RNS der höheren Pflanzen. Wie Abb. 11 zeigt, sind außer den r-RNS-Komponenten und der s-RNS zwei weitere Banden nach Anfärbung sichtbar, deren eine als DNS identifiziert wurde. Während der Ausdifferenzierung der Methylenblaufärbung verblaßte diese Bande im übrigen sehr rasch, sodaß aus ihrer Ausprägung keine Rückschlüsse auf die Menge gezogen werden können. Bei der zweiten Bande dürfte es sich um die 32 S-Vorstufe der r-RNS handeln.

Die Trennung im Polyacrylamidgel entspricht einer Molekularfiltration, in der Molekulargewicht und Sekundärstruktur der Nukleinsäuren entscheidend für die Wanderungsgeschwindigkeit der Molekeln sind. Die Basenzusammensetzung, die bei MAK und BPAK eine Rolle spielt, nimmt keinen Einfluß. Es ist daher nicht zu erwarten, daß die adenosinreiche m-RNS etwa in demselben Bereich erscheint wie auf den genannten Säulen. Die als 32 S bezeichnete Bande trägt zwar die höchste spezifische Aktivität, ist also "schnell markiert", doch ist die m-RNS sicher weder in dieser Menge noch in dieser Homogenität zu finden. Die Spekulation, welche der wenigen schwächeren Banden nun m-RNS sein könnte, wird in unserem Zusammenhang hinfallig durch den Befund, daß auch diese weit bessere Separation der RNS-Komponenten es nicht ermög-

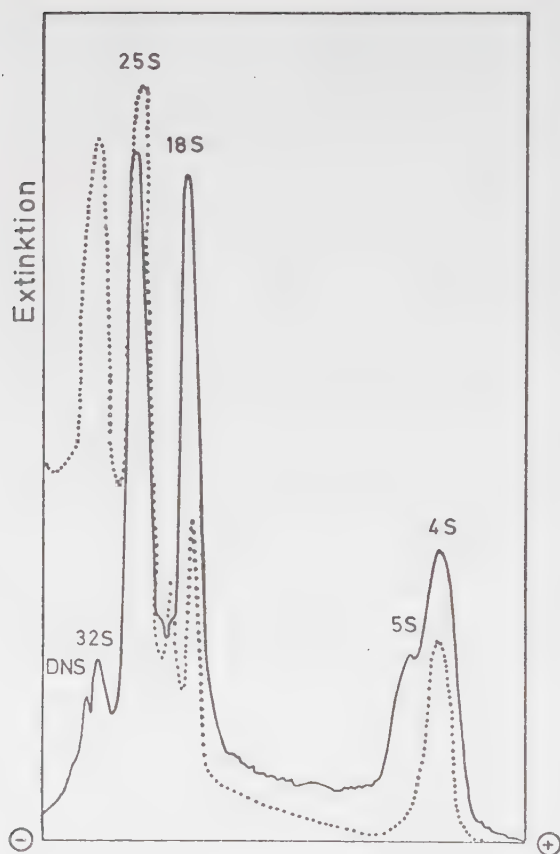


Abb. 11: Disk-Elektrophorese der Gesamtnukleinsäuren aus *Fus. aquaeductuum* nach 40-minütiger Belichtung. Markierung mit U- ^{14}C -Uridin (1,8 $\mu\text{Ci/ml}$).
 — UV-Absorption; ... Radioaktivität.

licht, lichtbedingte Unterschiede innerhalb der RNS nachzuweisen; beide Proben, belichtet und unbelichtet, sind den Meßergebnissen nach soweit identisch, daß sich in Abb. 11 ihre gesonderte Darstellung erübrigte.

2.5. Saccharose-Gradientenzentrifugation der Polysomen

Wie bereits in den letzten Abschnitten besprochen wurde, stört auf den MAK- und BPAK-Säulen der hohe Anteil der r-RNS, der die in demselben Bereich vermutete m-RNS überdeckt. In der Zelle liegt ein nicht in Funktion befindlicher Teil der Ribosomen als Monosomen vor. Werden die Nukleinsäuren des Gesamtzellinhalts extrahiert, so wird die r-RNS der Monosomen in allen Trennungsgängen als "Ballast" mitgeführt, der die Belasbarkeit der chromatographischen Methoden rasch erschöpft. Möglicherweise könnte durch die selektive Isolierung der Polysomen eine weitere Anreicherung der m-RNS erzielt werden.

Trennt man eine polysomenhaltige Zellfraktion von *Fus. aqueductuum* auf einem Saccharosegradienten, so erhält man nach der optischen Registrierung deutliche Peaks der Ribosomenuntereinheiten, der Monosomen und der Polysomen bestehend aus bis zu sechs abzählbaren Ribosomen auf dem m-RNS-Strang (Abb. 12). Aus Abb. 13 ist zu ersehen, daß die aufgetragene Radioaktivitätskurve im allgemeinen der UV-Absorptionskurve folgt. Lediglich im obersten Teil des Gradienten, in der Nähe des am Start zurückgebliebenen Materials, steigt die Aktivität steil und gegenüber der UV-Absorptionskurve überproportional an.

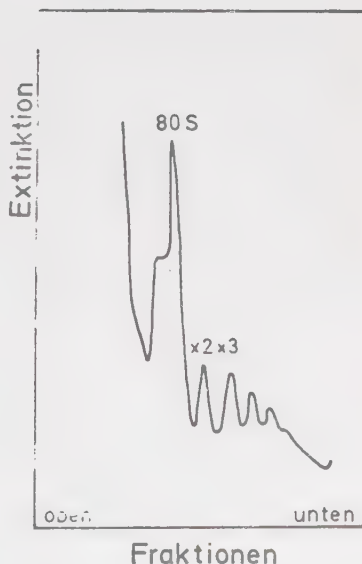


Abb. 12: Saccharose-Gradientenzentrifugation von Polysomen aus *Fus. aqueductuum*.

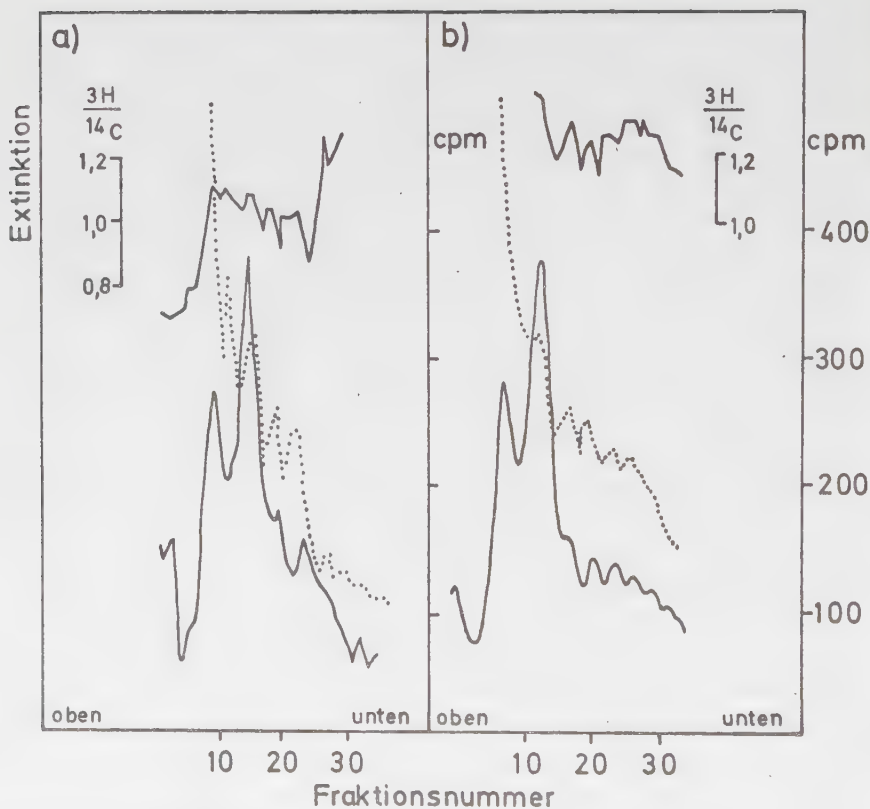


Abb. 13: Saccharose-Gradientenzentrifugation von Polysomen aus *Fus. aquaeductuum* nach a) 40, b) 70 Min. Belichtung. Markierung der belichteten Probe mit a) 1,0 uCi/ml, b) 0,25 uCi/ml U- ^{14}C -Uridin, der Dunkelkontrolle mit a) 4,0 uCi/ml, b) 1,0 uCi/ml G- ^3H -Uridin in den letzten a) 10, b) 40 Min. der Belichtung. — UV-Absorption; ... Radioaktivität.

Durch eine im Licht differentiell schnell markierte m-RNS sollte im Bereich der Polysomen, nicht aber bei Monosomen und Untereinheiten, der $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Quotient zugunsten des im

Licht gebotenen Nuklids verschoben sein. In Abb. 13 erkennt man, daß sich zwar der Quotient regelmäßig über den Polysomenpeaks entsprechend verändert, aber auch in gleicher Weise über den Monosomen und Untereinheiten.

Die Polysomen wurden stets unter Zusatz von CHI zu dem Extraktionsmedium isoliert, da von anderen Autoren (Lit. siehe TASCA u. HILLMANN, 1970) glaubhaft gemacht werden konnte, daß CHI die Transferase am 80 S-Ribosom durch eine Blockierung der Bewegung am Ribosom entlang hemmt. Eine Loslösung des m-RNS-Strangs vom Ribosom sollte demnach ebenfalls unterbunden sein und so eine Möglichkeit bestehen, die sehr labilen Polysomen (vornehmlich die cytoplasmatischen, während die strukturgebundenen stabiler sind) über die Extraktions- und Chromatographieprozedur hinweg intakt zu halten.

Man könnte deshalb annehmen, daß die unter dem Einfluß von CHI entstehenden Gedächtnisphänomene auf dieser beschriebenen Hemmwirkung auf die Transferase beruhen, indem der licht-induzierte "messenger" zwar gebildet, aber an seiner Translation gehindert wird. RNasen greifen diesen m-RNS-Ribosom-CHI-Komplex offensichtlich ebensowenig an wie eine normal funktionierende m-RNS im Polysom. Für diese Annahme sprechen die in Abb. 14 dargestellten Ergebnisse, die zeigen, daß nach Induktion unter CHI deutlich vermehrt Polysomen isoliert werden können, gleichlaufend mit einer Abnahme der Monosomen. Die radioaktive Markierung in diesen Versuchen mit CHI entsprach den zuvor bei den Experimenten ohne CHI beschriebenen Charakteristika; die Versuche führten also ebensowenig zu einer Fragestellung dieser Arbeit entsprechendem positivem Ergebnis.

2.6. Phenolextraktion der Polysomen

Extrahiert man die RNS aus den Polysomen mit Phenol, sollte eine mögliche Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch

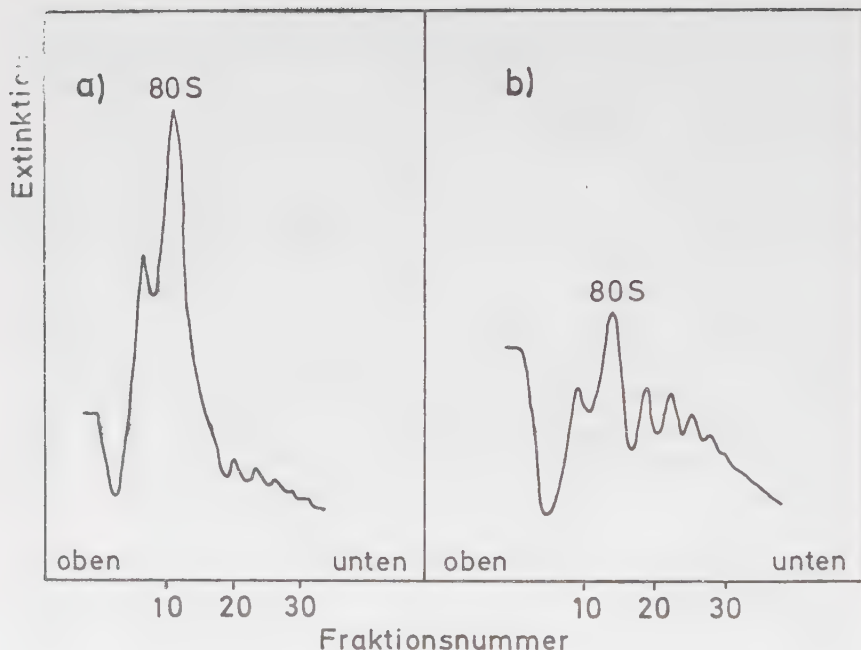


Abb. 14: Saccharose-Gradientenzentrifugation von Polysomen aus *Fus. aquaeductuum* nach 4-stündiger Belichtung a) ohne, b) mit CHI. – UV-Absorption.

ribosomale Proteine und m-RNP ausgeschlossen sein. Für diese Versuche wurden die Polysomen zunächst mit einem Saccharose-Stufengradienten isoliert. Daß es sich bei dem entstandenen Sediment tatsächlich um Polysomen handelte, zeigt Abb. 15: das anschließend in einem linearen Saccharosegradienten aufgetrennte Sediment ergibt das erwartete Bild einer Polysomenpräparation. Die dennoch vorhandenen Monosomen dürften durch die mechanische Beanspruchung der Polysomen entstanden sein.

MAK-Chromatographie der RNS aus derartig gewonnenen Poly-

somen zeigt im Elutionsprofil ohne Inkubation mit CHI (Abb. 16a) eine ähnliche Freigipfligkeit des r-RNS-Bereichs wie bei der Trennung von Gesamtnukleinsäuren aus Zellen nach Behandlung mit CHI (vergl. Abb. 8). Unterzieht man das gleiche Material einer Disk-Elektrophorese, dann erhält man im Prinzip das aus Abb. 11 bekannte Ergebnis (Abb. 17a). Die 4 S-RNS ist naturgemäß nur in geringfügigen Mengen, etwas mehr die ribosomale 5 S-RNS vorhanden (in Abb. 16a fehlten beide ganz); im höhermolekularen Bereich ist der dritte MAK-Gipfel ebensowenig als Einzelbande zu erkennen wie bei den Versuchen

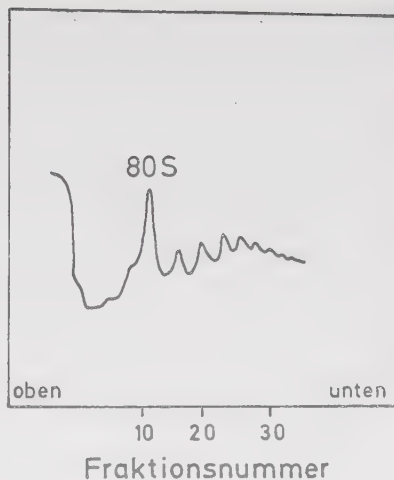


Abb. 15: Saccharose-Gradientenzentrifugation von mit einem Stufengradienten isolierten Polysomen aus *Fus. aquaeductum*. — UV-Absorption.

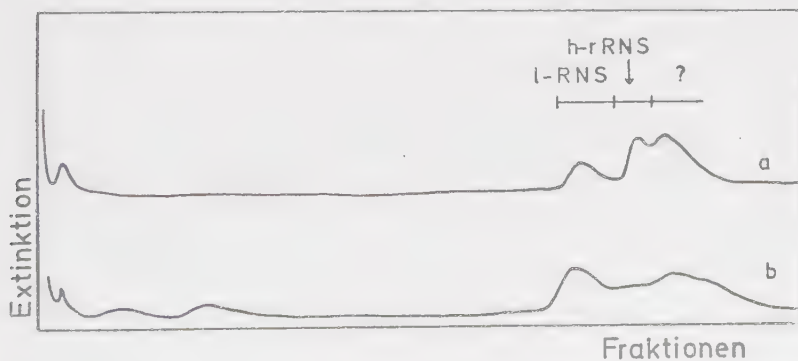


Abb. 16: MAK-Chromatographie der a) polysomalen RNS, b) nach EDTA-Behandlung im Überstand verbliebenen RNS.

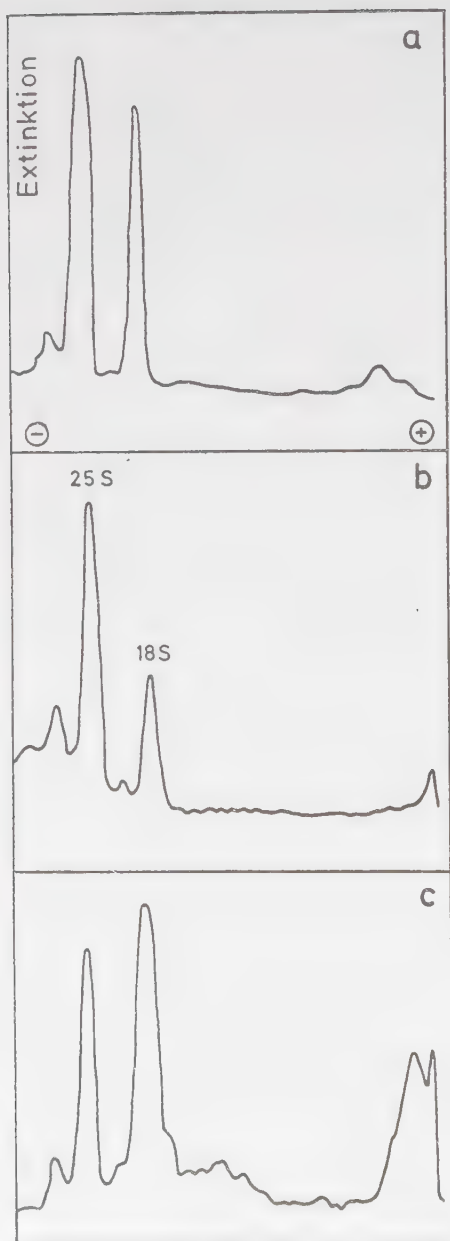


Abb. 17: Disk-Elektrophorese der a) polysomalen RNS, b) nach EDTA-Behandlung im Sediment vorhandenen RNS, c) nach EDTA-Behandlung im Überstand verbliebenen RNS aus *Fus. aquaeductuum*. – UV-Absorption.

unter CHI. Bei diesem durch den dritten Gipfel repräsentierten Material könnte es sich demnach sowohl bei den Versuchen mit CHI-beeinflußten Gesamtnukleinsäuren als auch bei der RNS aus Polysomen um dieselbe RNS-Spezies handeln.

Eine Auftrennung der polysomalen Bestandteile vor einer Phenolextraktion schien geraten. Senkt man die Mg^{++} -Konzentration in dem Polysomenmedium, so zerfallen diese schrittweise in ihre Untereinheiten. Die m-RNS sollte dabei frei werden und selektiv erfaßt werden können.

Die in der Literatur beschriebenen Methoden für die Freisetzung von m-RNS aus eukaryotischen Polysomen basieren allgemein auf dem Gebrauch von zwei Agentien: Magnesium-Chelatoren und Detergentien. Die verwendeten Detergentien spalten alle Nukleinsäure-Protein-Bindungen im Polysom und führen daher zum Erhalt aller Spezies polysomaler RNS, gleich ob tatsächlicher Bestandteil oder adsorbiertes Material. Da die Menge der m-RNS nur 1 - 2 % der gesamten polysomalen RNS ausmacht (LABRIE, 1969; ZOMZLEY et al., 1970) kann nach Detergentienbehandlung ihre Identifizierung durch Pulsmarkierung und durch ihre heterogenen Sedimentationskonstanten nicht als befriedigend betrachtet werden; diese beiden Kriterien können sie nämlich nicht gegen RNS abgrenzen, die aus dem Kern stammt und an die Polysomen adsorbiert wurde und auch nicht gegenüber Fragmenten ribosomaler RNS. Nur in solchen Fällen, in denen die gesamte m-RNS mehr oder weniger homogen ist wie in Reticulocyten oder Myoblasten, oder in Fällen, in denen es möglich war, ausschließlich eine Spezies von m-RNS radioaktiv zu markieren wie bei Zellen, die mit RNS-Viren infiziert waren in Gegenwart von Actinomycin, hat die Detergens-Extraktion zu einer Identifizierung der m-RNS geführt.

Die Verwendung von Magnesium-Chelatoren vermeidet die Totalextraktion polysomaler RNS. Allerdings wird die m-RNS nicht

als freies Molekül erhalten, sondern als ein RNS-Protein-Komplex (m-RNP). Da diese Komplexe verschiedene Sedimentationskonstanten besitzen, die sich zum Teil mit denen der Ribosomenuntereinheiten überlappen, ist eine Trennung auf einem Saccharosegradienten schwierig. Aussichtsreicher erschien es deshalb, die m-RNS aus den entstandenen Partikeln mit Phenol zu extrahieren.

Bei MAK-Chromatographie dieses Extrakts erhält man das in Abb. 16b dargestellte Ergebnis: gegenüber der Polysomenextraktion ist die h-rRNS nur andeutungsweise zu erkennen, während die l-rRNS und der in Abb. 16a erscheinende dritte Peak gut ausgebildet sind. Im niedermolekularen Bereich dürfte es sich wieder um 4 S- bzw. 5 S-RNS handeln.

Deutlich davon unterschieden sind die Resultate, die man durch Disk-Elektrophorese eines solchen Extrakts gewinnt: Stark ausgeprägt ist in Abb. 13c außer der l-rRNS hier auch die h-rRNS und wie bei dem Polysomenextrakt in Abb. 17a auch die 32 S-RNS. Neben einer Zunahme der niedermolekularen RNS ist daneben aber auch eine Vielzahl neuer Banden augenfällig, die etwa den Bereich von 8 - 16 S umschreiben. Betrachtet man nur diesen Bereich, sind die im Sinne dieser Untersuchungen gemachten Erwartungen insoweit erfüllt, als neue Banden sichtbar werden. Schwer erklärbar bleibt jedoch das Auftreten beider Hauptkomponenten der ribosomalen RNS und der 32 S-RNS-Vorstufe. Daß die eingesetzte EDTA-Konzentration tatsächlich die Polysomen quantitativ spaltet, ergibt sich aus dem Ergebnis einer Saccharose-Gradientenzentrifugation der behandelten Polysomenpräparation; darin sind selbst aber auch die Untereinheiten nicht mehr als Einzelgipfel erkennbar.

Immerhin besteht jedoch, wie aus einem Vergleich zwischen den Abb. 13b und 13c zu ersehen ist, ein deutlicher Unterschied zwischen der nach EDTA-Behandlung im Überstand erhal-

tenen RNS – die eventuell m-RNS enthält – und den in das Sediment gewanderten Untereinheiten. In der letzteren Fraktion fehlen die genannten Banden völlig, aber auch die niedermolekulare RNS. Außerdem ist im Verhältnis zur l-rRNS nur wenig h-rRNS vorhanden, was die Vermutung nahelegt, daß die in Abb. 13c erscheinende niedermolekulare RNS sich zum Teil aus Fragmenten dieser h-rRNS rekrutiert. Die angesprochenen neuen Banden zeigen nun aber weder eine signifikant erhöhte Markierung, noch einen lichtbedingten Unterschied im Anteil der beiden Nuklide. Es ist demnach nicht auszuschließen, daß es sich hierbei ebenfalls nur um Degradationsprodukte handelt, obwohl das gewonnene Profil gut reproduzierbar war und somit zumindest ein unspezifischer Abbau ausgeschlossen ist.

BLOBEL hat 1971 unter Verwendung von Puromycin als spaltendes Agens einen Weg aufgezeigt, nackte, nicht proteingebundene m-RNS von Reticulocytenpolysomen zu lösen. Die Methode soll den Vorteil besitzen, daß die einzige andere nackte RNS, die freigesetzt wird, t-RNS ist und daß die Ribosomenuntereinheiten strukturell und funktionell intakt bleiben. Die Anwendung der Methode von BLOBEL in unserem System war geplant, wurde jedoch zu Gunsten der im nächsten Abschnitt geschilderten Affinitätschromatographie zurückgestellt.

2.7. Affinitätschromatographie

In den letzten Jahren wurde entdeckt, daß menschliche, tierische und virale m-RNS (und hnRNS) Sequenzen von Poly(A) enthält, die etwa 40-250 Nukleotide lang und an das 3'-Ende kovalent gebunden sind (Lit. siehe GREENBERG u. PERRY, 1972; BECAREVIC et al., 1973). Seit 1972 sind solche Sequenzen von dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (FIRTEL et al., 1972) und neuerdings auch vom Mais bekannt (VAN DE WALLE, 1973). Poly(A) soll nach der Transkription an die hnRNS angehängt werden und ist möglicherweise zur korrekten

— ebenfalls hypothetischen — Umwandlung von HrRNS in m-RNS notwendig. Andere Autoren sprechen von einer Beteiligung der Poly(A)-Sequenz am Einfädungsvorgang ins Ribosom und weiter auch am Transport der m-RNS ins Cytoplasma. Das Vorkommen von Poly(A) und eines Enzyms, das dieses Polymer in eukaryotischen Zellen synthetisiert, ist seit längerem bekannt (Lit. siehe SHELDON et al., 1972); ebenso bekannt war der Adeninreichtum der "DNA-like RNA" bzw. "TB-RNS". Erst aber das Wissen um das Vorhandensein einer einheitlichen Adeninsequenz in der m-RNS eröffnete neue Möglichkeiten der Methodik zu ihrer Isolierung. Sie beruht auf der Reaktivität der Poly(A)-Sequenz mit Poly(dT) oder Poly(U) unter Bildung von Heteroduplexen, sowie auf ihrer Reaktion mit Zellulose (SCHUTZ et al., 1972) und Nitrozellulose (LEE et al., 1971). Mehrfach wurde eine Affinitätschromatographie an Poly(dT) oder Poly(U) beschrieben, die auf Trägern wie Zellulose, Sepharose oder Glasfaserfilter immobilisiert waren (MACH et al., 1973; ADESNIK et al., 1973 und SHELDON et al., 1972). GREENBERG u. PERRY (1972) hybridisierten die RNS mit Poly(U) vor einer Chromatographie auf Hydroxylapatit. FRASER u. LOENING (1973) markierten die m-RNS mit ^{14}C -Poly(U) zu deren Lokalisierung auf Polyacrylamidgelen. Die Fülle der Methoden unterstreicht aber die Tatsache, daß es offenbar bis jetzt keine generell anwendbare Methode für m-RNS verschiedener Herkunft gibt.

Nachdem die Affinitätschromatographie an auf Glasfaserfiltern immobilisiertem Poly(U) zu keiner Hybridisierung mit radioaktiver RNS führte, wurde deren Adsorption an Nitrozellulosefilter (BRAWERMAN et al., 1972) versucht. Gegenüber einer Kontrolle, bei der die nukleinsäurehaltige Lösung nur auf die Filter aufgetragen wird, sollte bei den chromatographierten Proben der $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Quotient jeweils zugunsten desjenigen Nuklids verschoben sein, das zur belichteten Probe zugegeben worden war. Selbst wenn die Filterplättchen für die Kontrolle vor dem Auftragen der Nukleinsäuren mit

Versuch Nr.	Einsatz der Nuklide	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Quotient der Kontrolle	Quotient Probe	Quotient Kontr./Probe
1	L^{14}C	1,9	0,95	2,0
	L^3H	0,86	0,85	1,01
2	L^{14}C	1,45	0,53	2,73
	L^3H	0,79	0,96	0,82
3	L^{14}C	3,3	0,9	3,66
	L^3H	0,55	1,1	0,50
4	L^{14}C	8,8	1,4	6,28
	L^3H	2,3	1,0	2,3

Tab. 3: Ergebnisse der Affinitätschromatographie auf Nitrozellulosefiltern. L^{14}C : Einsatz von ^{14}C -Uridin bei der belichteten Probe und von ^3H -Uridin bei der Dunkelkontrolle; L^3H : reziproker Ansatz. Mittelwerte aus je 5 Parallelproben.

derselben Puffermenge durchgespült werden wie sie insgesamt durch die Filterplättchen läuft, bleibt bei dieser Methode eine gewisse Unsicherheit. Mit zunehmender Menge Waschpuffer steigt nämlich die Zählausbeute für ^3H bei den Kontrollplättchen in Form einer Sättigungskurve an. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Nukleinsäurelösung diesen Effekt verändert.

Diese Unsicherheit der Methode kann nur mit einem reziproken Einsatz der Nuklide bei Licht- und Dunkelprobe einigermaßen umgangen werden. Das Mycel wurde in der in Abschnitt III.2.3. beschriebenen Weise 1 Std. unter GMI inkubiert und mit $\text{U-}^{14}\text{C}$ -Uridin bzw. $\text{U-}^3\text{H}$ -ridin markiert. Aus den in Tab. 3 zusammengestellten Ergebnissen wird deutlich, daß die postulierte

Quotientenverschiebung tatsächlich eintritt; sie ist nicht immer so eindeutig wie bei Versuch 2 und 3, aber in jedem Fall genügend markant. In den Versuchen 1 und 4 ist zwar auch bei dem Probenpaar mit tritierter Lichtprobe (L^3H) eine Quotientenverschiebung zugunsten von ^{14}C statt von 3H zu verzeichnen, sie ist aber weitaus geringer als bei dem Probenpaar mit ^{14}C -markierter Lichtprobe ($L^{14}C$). Man muß daher annehmen, daß die Nukleinsäurelösung als solche eine Verschiebung in Richtung einer höheren Zählausbeute für ^{14}C bewirkt, also tatsächlich nicht dem oben für die Kontrollproben beschriebenen Effekt des Waschpuffers folgt.

Betrachtet man zusammenfassend die Ergebnisse der Nukleinsäureuntersuchungen, so kann man feststellen, daß von den zahlreichen angewandten Methoden nur die Affinitätschromatographie Resultate lieferte, die im Sinne des Ziels dieser Arbeit interpretiert werden konnten. Damit wurde erstmals ein nicht auf der Verwendung von Hemmstoffen, also direkterer Hinweis dafür gewonnen, daß durch eine Photoinduktion eine spezifische RNS neu synthetisiert wird. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist allerdings Zurückhaltung geboten, da die erwartete Verschiebung des $^3H/^{14}C$ -Quotienten nicht bei allen Versuchen ganz eindeutig ausfiel (Tab. 3).

Es sind deshalb weitere Versuche mit noch zu verbessernder Methodik erforderlich, um dieses ermutigende vorläufige Ergebnis soweit abzusichern, daß man der Bedeutung eines möglichen positiven Befundes gerecht wird.

IV. Lichtinduzierte Veränderungen innerhalb der Proteine

In Fortführung der ersten orientierenden Versuche von FEULNER (1969) wurden die Extraktion mit Puffer P, die Ammonsulfatfraktionierung und die Disk-Elektrophorese in Trenngel Nr.1 in leicht veränderter Form übernommen. Darüberhinaus wurde versucht, auch basische Proteine zu erfassen und strukturgebundene in Lösung zu bringen. Im weiteren sollten immunologische Methoden Aufschlüsse über eine Enzymneusynthese liefern.

1. Methode

1.1. Versuchsansatz

Für alle in diesem Abschnitt geschilderten Experimente wurde, unabhängig von der nachfolgenden Aufarbeitung, die folgende Versuchsanstellung gewählt; Belichtung und sonstige Bedingungen entsprachen dabei den in Abschnitt I.3.1.1. für *Fus. oxysporum* geschilderten Verfahren:

Erlenmeyerkolben (Inhalt 1 L) mit 400 ml Nährlösung (bestehend aus den Salzen des Fries' Minimalmediums (siehe Abschnitt I.1.1.) unter Zusatz von 5 g Hefeextrakt (Difco) und 20 g Glucose) wurden mit jungem Mycel von *Fus. aquaeductuum* beimpft und 48 Std. auf der Schüttelmaschine im Dauerdunkel bei Raumtemperatur herangezogen. Nach dem Abnutschen wurde der Pilz 1 Std. unter "step-down"-Bedingungen in 1/60 M Phosphatpuffer, pH 4,7 mit 2 % Glucose gehalten, sodann in dasselbe Medium mit 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$ $\text{U-}^{14}\text{C}$ -Leucin überführt und die Hälfte 3 Std. bei Raumtemperatur belichtet, die andere Hälfte unter gleichen Bedingungen im Dunkeln belassen. Sofort nach Beendigung der Belichtung wurden beide Proben abgenutscht und rasch tiefgefroren.

1.2. Extraktion der löslichen Proteine

In einer Reibschale wurde das Mycel (ca. 5 g Frischgewicht) mit 5 g Seesand (Merck) in 20 ml Puffer P (10 mM Phosphatpuffer, pH 7,5; 3 mM MgCl_2 ; 5 mM 2-Mercaptoäthanol) etwa 15 Min. lang kräftig zerrieben und das Homogenat weitere 30 Min. im Eisbad geschüttelt. Nach Zentrifugationen von 10 Min. bei 4 000 g_{AV} , 30 Min. bei 12 000 g_{AV} und 60 Min. bei 110 000 g_{AV} wurde der Überstand in einer Glaswollensäule von Fettpartikeln befreit und mit 40, 50, 60 und 70 % Ammonsulfat fraktioniert gefällt. Die für die jeweilige Endkonzentration berechnete Menge eiskalter gesättigter Ammonsulfatlösung wurde hierbei langsam in den Überstand eingerührt und mindestens 20 Min. im Eisbad gehalten. Die Zentrifugation der entstandenen Niederschläge erfolgte jeweils 20 Min. bei 20 000 g_{AV} . Die Sedimente wurden in 2 ml Puffer P gewaschen, in 1 ml desselben Puffers aufgenommen und über Nacht gegen Puffer P dialysiert (Visking-Dialysierschlauch 8/32). Der nach der Fällung mit 70 % Ammonsulfat verbliebene Überstand wurde ebenfalls dialysiert und anschließend gegen trockenes Dextran T 70 (Roth) stark eingeeengt.

1.3. Extraktion der strukturgebundenen Proteine

1.3.1. Extraktion mit Hilfe von Detergentien

Versuchsansatz und Homogenisation erfolgten wie beschrieben. Das Homogenat aus dem Mycel (ca. 15 g Frischgewicht) wurde jetzt aber mit Puffer P verdünnt und 10 Min. in swing-out-Bechern (100 ml) mit 700 g_{AV} , anschließend der dadurch erhaltene Überstand 15 Min. bei 40 000 g_{AV} zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment zweimal mit 80 ml Puffer P gewaschen, dann mit 2 ml TMBD-Puffer (80 mM Tris-acetat, pH 7,4; 10 mM 2-Mercaptoäthanol; 0,5 % Drij 58 (Serva); 0,2 % DOC) versetzt und unter gelegentlichem kräftigem Schütteln 10 Min. im Eisbad belassen. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 110 000 g_{AV} wurde der Überstand

über Nacht gegen denselben Puffer dialysiert (Fraktionen "BDÜD" bzw. "BDÜL" für Dunkelkontrolle bzw. Lichtprobe; siehe jeweils Schema Abb. 18); das Sediment wurde mit 2 ml TMS-Puffer (80 mM Tris-acetat, pH 7,4; 10 mM 2-Mercapto-Äthanol; 0,3 % SDS) bei Raumtemperatur in derselben Weise wie zuvor re-extrahiert und gegen TM-Puffer (TMS-Puffer ohne SDS) ebenfalls über Nacht dialysiert (Fraktionen "SÜD" bzw. "SÜL").

Das Sediment aus der Zentrifugation mit $700 g_{AV}$, das die Zellbruchstücke und wenige intakte Zellen enthielt, wurde dreimal mit Puffer P gewaschen, mit 4 ml TMBD-Puffer 10 Min. extrahiert (Fraktionen "BDSD" bzw. "BDSL"), 10 Min. mit $12\,000 g_{AV}$ zentrifugiert, einmal mit 80 ml Puffer P gewaschen und mit 4 ml TMS-Puffer extrahiert und zentrifugiert (Fraktionen "SSD" bzw. "SSL"). Die Überstände aus beiden Extraktionen wurden 15 Min. bei $110\,000 g_{AV}$ geklärt und gegen TM-Puffer dialysiert.

Da es sich gezeigt hat, daß nach der TMBD-Extraktion durch Behandlung mit SDS keine weiteren Proteine mehr aus den Sedimenten herausgelöst werden, entfiel diese in späteren Versuchen und die TMBD-Extraktion wurde aufgeteilt in eine erste mit TMD-Puffer (TM-Puffer; 0,5 % DOC; Fraktionen "DÜD" bzw. "DÜL" und "DSD" bzw. "DSL") und eine zweite mit TMB-Puffer (TM-Puffer; 0,5 % Brij 58; Fraktionen "BÜD" bzw. "BÜL" und "BSD" bzw. "BSL").

1.3.2. Herstellung und Extraktion von Acetonpulver

Das dann noch verbliebene Sediment wurde nach der Methode von BERNATH u. SINGER (1962) zu Acetonpulver verarbeitet: Der breit ausgestrichene Sedimentbrei wurde rasch mit 150 ml Aceton von -25°C versetzt, unter Schütteln 15 Min. bei derselben Temperatur gehalten, auf Filtrierpapier abfiltriert, je zweimal mit 20 ml Aceton und 20 ml Äther

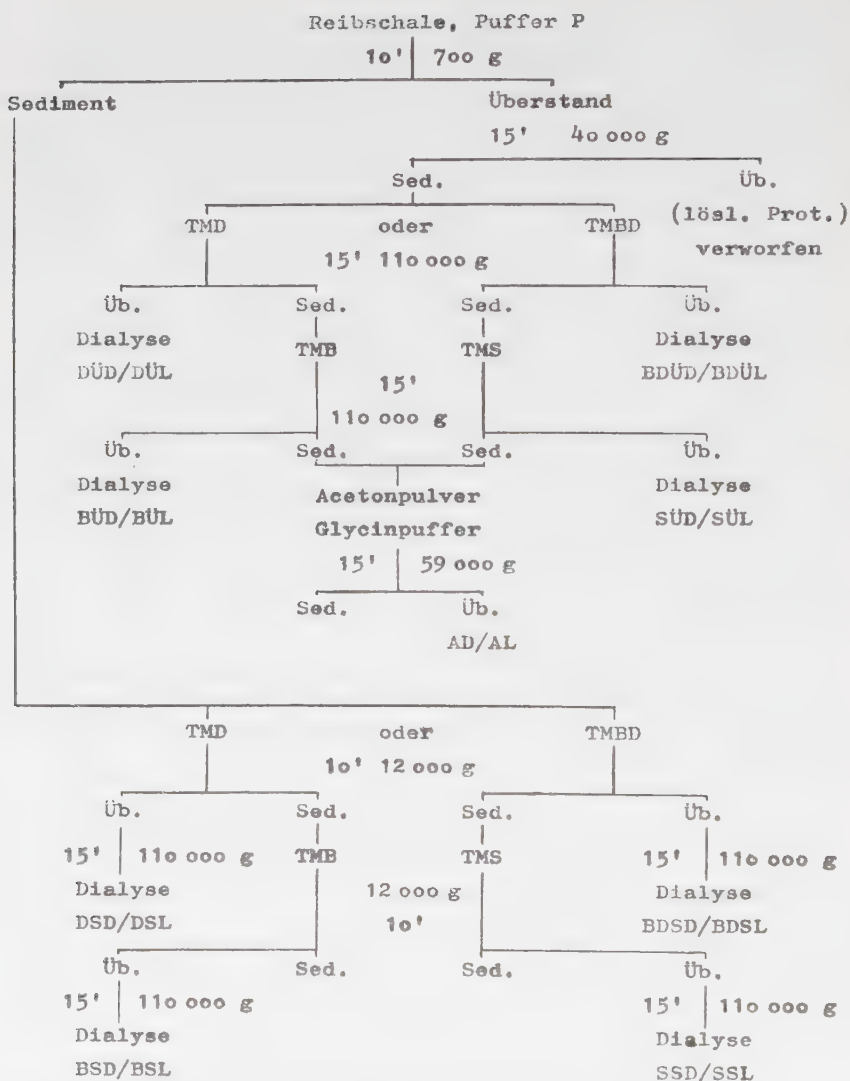


Abb. 18: Aufarbeitungsschema für die Extraktion struktur- gebundener Proteine. Abkürzungen siehe Abschnitt IV.1.3.

gewaschen und bei Raumtemperatur unter vermindertem Druck (100 Torr) getrocknet. Mit 1 ml 60 mM Glycin-NaOH-Puffer, pH 10,3, wurde das Pulver 10 Min. extrahiert und 15 Min. bei $59000 g_{\max}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Dowex 5W x 8 (H^+ -Form) neutralisiert (Fraktionen "AD" bzw. "AL").

Die gesamte Aufarbeitung erfolgte bei einer Temperatur von $0-4^{\circ}C$, falls keine anderen Angaben gemacht sind. Sie ist im Schema in Abb. 18 dargestellt.

1.4. Bestimmung der Proteinkonzentration

Eine Proteinbestimmung war erforderlich, um bei der Disk-Elektrophorese von jeder Fraktion gleiche Mengen auftragen und um bei der Immunisierung der Kaninchen für Licht- und Dunkelprotein gleiche und definierte Mengen verabreichen zu können. Zur Erstellung der Eichkurven diente eine Lösung von Rinderserumalbumin (Fluka) als Standard.

Bei der Bestimmung nach LOWRY (LOWRY et al., 1951) wurden die dialysierten Proteinfractionen mit 0,1 n NaOH in den Meßbereich der Methode verdünnt (ca. 100-fach). Zu 1 ml dieser Lösung wurden 5 ml einer frisch angesetzten Mischung aus 100 ml 2%igem Na_2CO_3 (wasserfrei), 1 ml 1%igem $CuSO_4$ und 1 ml 2%igem K-Na-tartrat zupipettiert und nach 10 Min. 0,25 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagens (Merck) zugegeben. Nach weiteren 35 Min. wurde die Extinktion im Spektralphotometer (Hitachi Perkin-Elmer, Modell 139) bei 750 nm gemessen.

Bei der Methode nach LOWRY stören Phenole und vor allem Sulfhydrylreagentien (GEIGER u. BESSMAN, 1972). Zur Kontrolle der mit dem LOWRY-Test erhaltenen Werte wurde deshalb, soweit es die Proteinkonzentration erlaubte, die Trübung bestimmt, die durch Fällung mit TCA erreicht wird. Hierzu

wurden 1,4 ml Proteinlösung mit 2,1 ml 10%iger TCA versetzt und die Extinktion nach 30 Sek. bei 450 nm gemessen. Im Bereich von 0,1 mg bis 3,0 mg stellt die hervorgerufene Trübung eine lineare Funktion der in der Lösung vorhandenen Menge dar.

1.5. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Saure Proteine: Die erhaltenen Proteinfraktionen wurden mittels der Disk-Elektrophorese weiter aufgetrennt. Dies geschah vornehmlich mit dem in MAURER (1968) beschriebenen Gelsystem Nr. 1. Für 10 Gele (0,6 x 8 cm) wurden gemischt:

- 1) 9,15 g Tris-HCl, pH 8,9;
 0,115 ml N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (Serva);
 in 100 ml H₂O 3,3 ml
- 2) 30 g Acrylamid (Serva);
 0,8 g N,N'-Methylbisacrylamid (Serva);
 in 100 ml H₂O 6,6 ml
- 3) H₂O 3,3 ml
- 4) 0,14 % Ammoniumperoxodisulfat, frische Lösung 13,2 ml

Acrylamid wurde zuvor in Chloroform, N,N'-Methylbisacrylamid in Aceton umkristallisiert (siehe Abschnitt III.1.5.2.) Diese von LOENING zur elektrophoretischen Trennung von Nukleinsäuren beschriebene Reinigung erwies sich auch bei der Elektrophorese von Proteinen als eine für Kontrast und Auflösungsvermögen der Methode förderliche Maßnahme.

Sofort nach dem Beschicken der Röhrchen wurde das Gemisch mit Puffer überschichtet und 30 Min. bei Raumtemperatur zur Polymerisation belassen. Die Kammern der Elektrophoreseapparatur wurden mit im Verhältnis 1:10 verdünntem Tris-Glycin-Puffer, pH 8,3 (6,0 g Tris; 28,8 g Glycin in 1 Liter H₂O) gefüllt, 0,1 ml der mit 10 % Saccharose beschwerten Protein-

lösung unterschichtet und nach einer Eindringzeit von 15 Min. bei 1/4 der Stromstärke bei 4°C mit 2 mA/Gel getrennt. Zur Markierung der Front dienten einige Tropfen einer 0,001%igen Bromphenolblaulösung im Kathodenpuffer.

Nach Beendigung des Laufs wurden die Gele mit Hilfe einer Sonde aus den Glasröhrchen herausgelöst und 1 Std. in 10 ml 12,5%iger TCA fixiert. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mit einer 1%igen wässrigen Coomassie-Brilliant-Blue R 250-Lösung (Serva), von der je 0,5 ml zu den in der Fixierlösung befindlichen Gelen gegeben wurden. Coomassie-Brilliant-Blau löst sich in TCA im Gegensatz zu Wasser nur kolloidal, sodaß sich vornehmlich nur die Banden und weniger das Gel anfärben, wodurch sich kurze Differenzierungszeiten (in 12,5%iger TCA) ergeben.

In einigen Fällen wurde TBE-Puffer (90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 25 mM EDTA; pH 8,3 ohne Justierung) statt Tris-Glycin als Kammerpuffer verwendet. Obwohl dabei der pH-Wert unverändert geblieben war, ergaben sich doch einige Unterschiede im Trennverhalten der Proteine.

Basische Proteine: Um basische Proteine, die im Gelsystem Nr. 1 rückwärts zur Kathode wandern, zu erfassen, wurde das Gelsystem Nr. 5 (MAURER, 1968) mit in die Untersuchungen einbezogen; hierzu wurden gemischt:

- 1) 19 g Glycin, mit KOH auf pH 7,3 titriert
0,08 ml N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (Serva)
in 100 ml H₂O; 21,0 ml
- 2) 60 g Acrylamid (Serva)
1,6 g N,N'-Methylbisacrylamid (Serva)
in 100 ml H₂O; 3,5 ml
- 3) 0,56 % Ammoniumperoxodisulfat, frische Lösung; 3,5 ml

Als Elektrodenpuffer wurde im Verhältnis 1:10 verdünnter Glycin-Lutidin-Puffer, pH 8,3, verwendet (13,7 g Glycin; 38,2 ml Lutidin (Merck) pro Liter H_2O). Die Polung war entsprechend umgekehrt; im übrigen wurde wie bei den sauren Proteinen verfahren.

1.6. Trocknung und Autoradiographie; Densitometrie

Zur Dokumentation wurden die Gele zunächst photographiert und sodann die ausdifferenzierten Proteinbanden im Densitometer in der in Abschnitt III.1.5.5. dargestellten Weise vermessen. Trocknung und Autoradiographie erfolgten entsprechend Abschnitt III.1.5.4. Die Radiogramme wurden ebenfalls im Densitometer ausgewertet.

1.7. Messung der Radioaktivität

In vielen Fällen wurde die Radioaktivität direkt bestimmt. Hierzu wurden die Gele in 2 mm dicke Scheibchen geschnitten und in Szintillationsgläsern mit 0,5 ml H_2O_2 (30%ig) versetzt, über Nacht bei 60°C gehalten; dann wurden 0,2 ml Soluene-100 (Packard) zugefügt und zunächst 2 Std. bei Raumtemperatur, dann 5 Std. bei 60°C unter gelegentlichem Schütteln belassen. Das inzwischen klare Gemisch wurde in 10 ml Dioxan-Cocktail (100 g Naphtalin, 5 g PPO/Liter Dioxan) aufgenommen und nach Abklingen der Chemolumineszenz im Szintillationszähler gemessen. Die Quenchkorrektur erfolgte sinngemäß Abschnitt III.1.4.

1.8. Immunologische Methoden

1.8.1. Extraktion der Antigene

Entsprechend den für eine Immunisierung erforderlichen hohen Proteinkonzentrationen mußte die für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendete Extraktionsmethode verändert werden. Es wurden dazu ca. 2,5 g Pilzmycel, das wie

üblich angezogen und dann 3 1/2 Std. belichtet bzw. im Dunkeln belassen wurde, mit 2 ml KMBD-Puffer (80 mM KH_2PO_4 , pH 7,4; 10 mM 2-Mercaptoäthanol; 0,5 % Brij 58; 0,2 % DOC) mit Hilfe des Ultraschallidesintegrators (Branson Sonifier B 12) bei 70 - 80 Watt Leistungsabgabe 10 Min. zerschallt. Das dickliche Homogenat wurde durch Zentrifugieren bei 700 g_{AV} (10 Min.) in swing-out-Bechern von den Zellbruchstücken befreit und anschließend 60 Min. bei 110 000 g_{AV} geklärt. Aus dem Sediment wurde in der bereits beschriebenen Weise Acetonpulver hergestellt (Abschnitt IV.1.3.2.) und dieses mit je 0,7 ml 60 mM Glycin-NaOH-Puffer, pH 10,3, 10 Min. unter kräftigem Schütteln extrahiert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 59 000 g_{max} wurde der Überstand mit dem ribosomenfreien Überstand der KMBD-Extraktion vereinigt und der Proteingehalt bestimmt. Alle Arbeitsgänge wurden bei 0 - 4°C ausgeführt.

1.8.2. Immunisierung

Die Immunisierung der Kaninchen führt in dankenswerter Weise Herr Dr. Schmitt diel vom Staatl. Institut für Tierseuchenbekämpfung, Schleißheim, durch. Der Rohextrakt (2 ml mit kontinuierlich steigenden Mengen von 10 bis zu 60 mg/ml Protein) wurde über einen Zeitraum von 6 Wochen intravenös in Abständen von 3 Tagen gespritzt. Danach war kein Ansteigen des Antikörpertiters mehr festzustellen. Von den beiden Tieren wurden je ca. 20 ml "Licht-" bzw. "Dunkelserum" gewonnen und portionsweise tiefgefroren.

1.8.3. Immunodoppeldiffusion (OUCHTERLONY-Test)

Der Anstieg des Antikörpertiters wurde nach Probeblutungen im OUCHTERLONY-Test (OUCHTERLONY, 1949) verfolgt. Ein Objektträger wurde mit 1 ml einer Mischung aus gleichen Teilen 2 % Agarose und 75 mM Veronalpuffer, pH 8,3, beschickt und die entstandene 1 mm dicke Schicht gelieren lassen. Zum Schutz

vor Mikroorganismen enthielt das Gel 0,02 % Natriumazid. In 1 cm Abstand ihrer Mittelpunkte wurden sodann 6 Löcher um ein zentrales Loch mit je 2 mm Durchmesser gestanzt und mit einer Pasteurpipette ausgesaugt. Das zentrale Loch wurde mit 3 μ l Antigen gefüllt (50 mg/ml), in den peripheren Löchern befand sich eine Antiserumverdünnungsreihe. Nach Erreichen des maximalen Antikörpertiters wurden einige Versuche mit reziproker Füllung der Löcher durchgeführt. Die Doppeldiffusion lief 40 Std. lang bei 4°C ab.

Die deutlich sichtbaren Präcipitationslinien wurden in 0,9%iger NaCl-Lösung für 48 Std. von nicht gefällttem Protein befreit und das Agarosegel über Nacht bei Raumtemperatur unter einem feuchten, nicht fusselnden Filtrierpapier getrocknet. Das Filtrierpapier nahm einen Großteil des NaCl auf und erübrigte so ein Auswaschen der Salzlösung. Nach 5-minütigem Fixieren in 2%iger Essigsäure wurden die Fällungslinien mit 0,5 % Coomassie-Brilliant-Blue R 250 (Serva) in 96 % Äthanol-Eisessig-Wasser 4,5:1:4,5 (v/v/v) für 30 - 45 Min. gefärbt und gegen dasselbe Lösungsmittelgemisch 30 Min. lang entfärbt.

1.8.4. Immunoelektrophorese

Die Antigenlösungen wurden auf eine Konzentration von 30 mg/ml gebracht. Die Antisera mußten durch Lyophilisation und Wiederaufnahme in bi-distilliertem H₂O auf das fünffache konzentriert werden. Zur Elektrophorese wurde eine entfettete Glasplatte (7,6 x 21 cm) mit 1 % Agarose in Veronalpuffer (siehe Abschnitt IV.1.8.3.) 1 mm dick beschichtet. In einem Abstand von 1,3 cm voneinander wurden die Startlöcher gestanzt (ϕ 2 mm) und mit 3 μ l Antigen gefüllt. Als Marker für die Wanderungsfront wurde in die beiden äußersten Löcher eine Bromphenolblaulösung eingebracht. Die Trennung erfolgte unter Kühlung auf 4°C in einer Shandon-Elektrophoresekammer (Modell U 77) für ca. 2 Std. bei einer Spannung von 350 Volt.

Nach Beendigung des Laufs wurden in der Mitte zwischen den Startlöchern parallel zur Trennungsrichtung 1 mm breite Rinnen gestanzt, die mit Antisera gefüllt wurden. Zur Bildung der Präcipitationsbögen wurde die Agaroseplatte 48 Std. bei 4°C in einer feuchten Kammer belassen. Waschen, Fixieren, Trocknen und Färben geschah in der beim OUCHTERLONY-Test beschriebenen Weise.

1.8.5. Immunopräcipitation

Antigen (60 mg/ml) aus belichtetem Mycel wurde mit einem geringen Überschuß Antikörpern (mit Protein aus dunkel gehaltenem Mycel hervorgerufen: "DAK" und zur Kontrolle aus belichtetem Mycel: "LAK") und 0,1 % Natriumazid versetzt und für 48 Std. bei 4°C belassen. Das entstandene weiße Präcipitat wurde 10 Min. bei 9000 g_{max} abzentrifugiert und der Überstand, der nun nur noch die differentiell durch Licht induzierten Proteine bzw. bei der Kontrolle keine mehr enthalten sollte, der Immunoелеktrophorese unterworfen.

2. Ergebnisse

Für die Untersuchungen zum direkten Nachweis einer de-novo-Synthese von Enzymen bei der lichtinduzierten Carotinoidsynthese war es zunächst notwendig, über die von FEULNER (1969) erarbeiteten Hinweise hinaus die Trennungsmethode für Proteine, vornehmlich im Bezug auf die Trennschärfe und Reproduzierbarkeit, zu verbessern. Eine sehr deutlich erhöhte Trennschärfe konnte bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese durch die Vorreinigung der Gelsubstanzen erzielt werden. Im Gegensatz dazu war es jedoch nicht möglich, die Reproduzierbarkeit soweit zu optimieren, daß von Versuch zu Versuch völlig identische Resultate erhalten wurden. Es zeigte sich immer wieder, daß zwar innerhalb eines Versuchsansatzes die Licht- und Dunkelproben weitgehendst übereinstimmten, jedoch zu entsprechenden Parallelversuchen bei grober Betrachtungsweise Diskrepanzen bestanden. Bei genauerer Analyse waren die Unterschiede meist nur quantitativer Natur; die sehr kräftig auftretenden Proteinbanden konnten in jedem Versuch dargestellt werden, die Variationen betrafen in erster Linie die zwischen ihnen auftretenden schwächeren Banden.

Trotz der Konstanz der Anzuchts- und Versuchsbedingungen muß man den jeweiligen physiologischen Zustand der Zellen für diese Schwankungsbreite verantwortlich machen; ein Einfluß der Elektrophoresebedingungen konnte durch wiederholten Lauf desselben Materials ausgeschlossen werden, da hierbei immer identische Resultate erzielt wurden.

2.1. Unterschiedliches Verhalten der Licht- und Dunkelproben bei der Extraktion

Bei allen Versuchen konnte festgestellt werden, daß die belichtete Probe und die Dunkelkontrolle nicht gleich gut extrahierbar waren. Vor allem in den Ergebnissen der Proteinbestimmung war dieser Umstand zu registrieren; die belich-

tete Probe lieferte bis zu 50 % weniger Protein als aus der Dunkelkontrolle extrahiert wurde. Eine gegenteilige Tendenz war nie zu beobachten, weder bei der Homogenisation in der Reibschale, noch bei der Ultraschallintegration. Die mikroskopische Untersuchung der beiden Homogenate zeigte, daß die Lichtprobe noch einen Großteil intakter Zellen enthielt.

Offensichtlich wird die Zelle durch die Belichtung dahingehend verändert, daß sie eine größere mechanische Festigkeit erhält. Welcher Natur diese Veränderungen sind, konnte nicht geklärt werden; zumindest eine Beteiligung von Lipiden war nach chromatographischen Befunden weder quantitativ noch qualitativ nachzuweisen. Das deutet darauf hin, daß durch die Belichtung wohl keine zusätzlichen Membranen gebildet werden, in die sich selektiv die gebildeten Carotinoide einlagern. Vielmehr werden die vorhandenen Membransysteme eingefärbt: bei der Zellfraktionierung (siehe Schema Abb. 18) wird im Sediment der Zentrifugation mit 40 000 g eine scharf abgegrenzte Schicht erhalten, die bei der Dunkelkontrolle gelblich-weiß, in belichtetem Material aber lebhaft orange gefärbt ist. Diese durchsichtig-gallertige Fraktion läßt sich mit Detergentien wie Triton X-100 und Brij 58 leicht in Lösung bringen; es dürfte sich daher um Membranen handeln.

An der geringeren Mächtigkeit dieser Sedimentschicht im belichteten Material war im übrigen ebenfalls die unterschiedliche Extrahierbarkeit der beiden Mycelien ganz augenfällig zu beobachten. Selbst eine drastisch verlängerte Homogenisation erhöhte die Proteinausbeute nur unerheblich. Inwieweit diese lichtbedingten Veränderungen in der Ultrastruktur der Zelle begründet sind, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

2.2. Die löslichen Proteine

Werden die durch fraktionierte Ammonsulfatfällung gruppierten löslichen Proteine mittels der Disk-Elektrophorese aufgetrennt, erhält man vor allem in den niederen Fraktionen eine Fülle von Banden, die oft nicht scharf voneinander zu trennen sind. Dies ist vor allem in der 40 %-Fraktion der Fall, bei der zudem ein Teil des Materials irreversibel gefällt wird. Artifizielle Proteinaggregate und Bruchstücke beeinflussen hier möglicherweise die Trennung.

Die Fülle der erhaltenen Banden steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von SUBDEN u. TURIAN (1970), die bei *Neurospora crassa* im Gesamtextrakt ohne Ammonsulfatfraktionierung nur eine geringe Zahl von Banden erhielten. Unter diesen wenigen Banden konnten sie darüberhinaus auch noch eine neue, durch Licht induzierte Bande registrieren. Aus unseren Untersuchungen geht hervor, daß für *Fus. aquaeductuum* keine entsprechenden lichtbedingten Unterschiede abzusichern sind.

In Abb. 19 sind zwei repräsentative Beispiele wiedergegeben. Wohl sind, wie diese Abb. zeigt, belichtete Probe und Dunkelkontrolle in ihrer densitometrischen Auswertung nicht immer vollständig deckungsgleich, doch beruhen diese geringen Differenzen auf dem Zusammenwirken der Trennschärfe des einzelnen Gels mit dem Auflösungsvermögen des Densitometers. Aus der unmittelbaren Betrachtung der Gele kann man im Vergleichsweg keine signifikanten Unterschiede zwischen belichteten und unbelichteten Proben feststellen. Da durch den Druck viele Einzelheiten einer photographischen Abbildung verlorengehen, besitzt die Densitometerkurve bei allen ihr anhaftenden Mängeln doch für eine Dokumentation in der vorliegenden Art mehr Informationsgehalt. Dies zeigt sich besonders dann, wenn die Densitometerkurven der Autoradiogramme direkt darüber projiziert werden können (siehe z. B. Abb. 22).

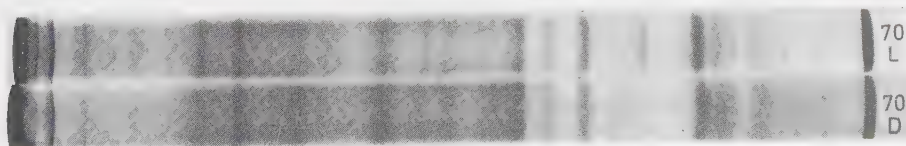
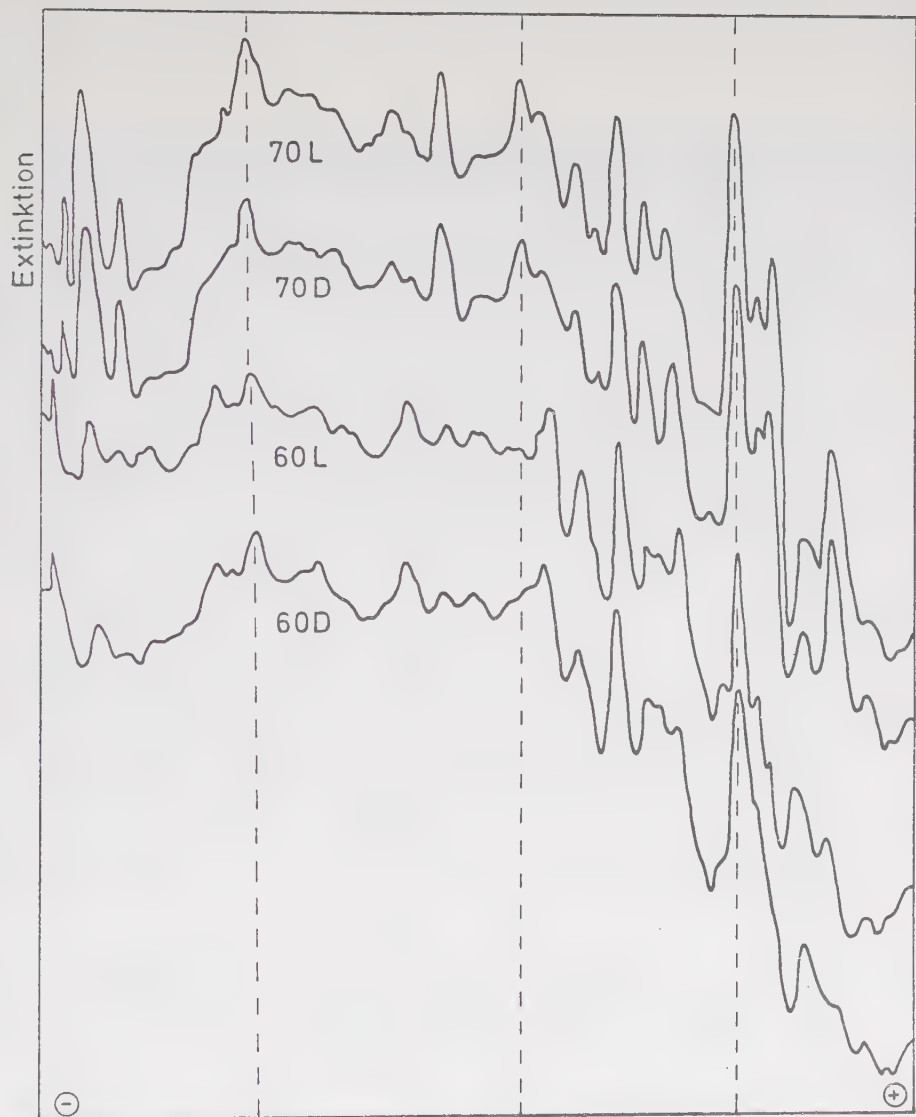


Abb. 19: Disk-Elektrophorese der mit Ammonsulfat fraktioniert gefällten Proteine aus *Fus. aquaeductuum*, 60 % und 70 %-Fraktionen; L: nach 1-stündiger Verarmung 3 Std. belichtet; D: Dunkelkontrolle. — Absorption nach Anfärbung.

Die Ammonsulfatfällung grenzt naturgemäß die Proteinfractionen nicht scharf gegeneinander ab; es sind vielmehr gleitende Übergänge vorhanden, sodaß stark ausgeprägte Banden in zwei oder mehr Fraktionen nebeneinander erscheinen; schwächere Banden sind meist nur in einer oder zwei Fraktionen als solche sichtbar.

Bei einer Photoinduktion in Gegenwart von CHI müßte nach allem, was bisher darüber bekannt ist, in *Fus. aquaeductuum* die de-novo-Synthese von carotinoidbildenden Enzymen unterbleiben. Die mit CHI behandelte Probe ist nun aber nicht mit einer Dunkelkontrolle gleichzusetzen, obwohl in beiden keine de-novo-Synthese erfolgt; CHI unterbindet nämlich auch die im Dunkeln ablaufende geringe Carotinoidsynthese, darum sollte auch die Bildung der an dieser Dunkelsynthese beteiligten Proteine gehemmt sein. Aufgrund früherer Untersuchungen (THEIMER, 1968) kann angenommen werden, daß diese Proteine einem hohen turn-over unterliegen, sodaß die noch vorhandenen Moleküle rasch abgebaut werden sollten. Falls an der im Dunkeln ablaufenden Synthese und an der lichtinduzierten dieselben Proteine beteiligt sind, sollten so die nötigen Voraussetzungen bestehen, um eine de-novo-Synthese erkennen zu können.

Die Abb. 20 zeigt die Auswirkungen einer Inkubation mit CHI auf das Proteinmuster. Gegenüber einer ohne CHI belichteten Probe sind, wie das Beispiel der 80 %-Fraktion erkennen läßt, keine neuen Proteinbanden vorhanden.

An dieser Stelle muß hervorgehoben werden, daß auch nach der Vortrennung mit Ammonsulfat nicht jede Bande nur ein Protein repräsentiert. Eine Bande kann auch unter den Bedingungen der Elektrophorese entstandene Proteinaggregate darstellen, oder auch durch Proteine gebildet werden, die dieselbe Mobilität besitzen. Es ist also durchaus möglich, daß eine vergleichsweise geringe Menge neu synthetisierter

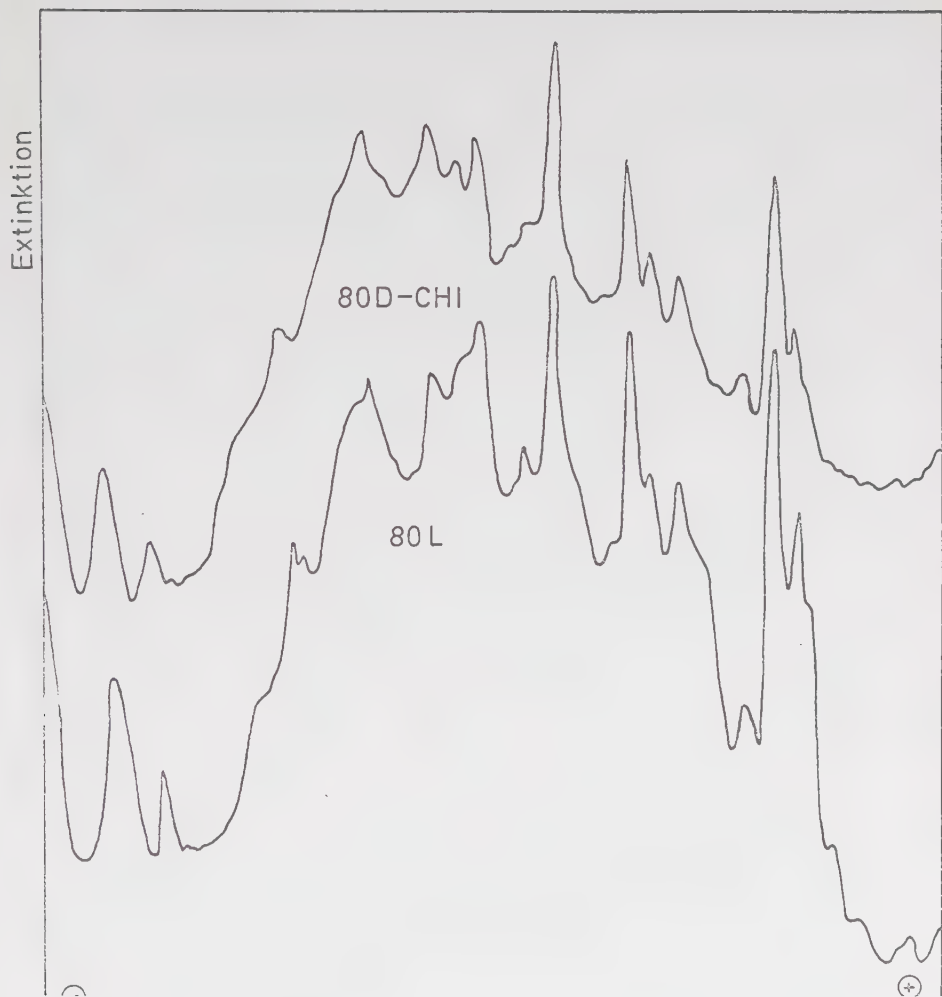


Abb. 2o: Disk-Elektrophorese der mit Ammonsulfat fraktioniert
gefällten Proteine aus *Fus. aquaeductuum*, 8o %-Frak-
tion. CHI: Mycel mit 6o uM CHI inkubiert. — Absorp-
tion nach Anfärbung.

Proteine von anderen in derselben Bande überdeckt wird.

Die von THEIMER u. RAU (1969) durch UV-Bestrahlung gewonnenen "RD"-Mutanten von *Fus. aquaeductuum* synthetisieren auch ohne Lichtinduktion große Mengen an Carotinoiden; das sie synthetisierende System ist darin offenbar völlig dereprimiert. Die bei der Carotinoidsynthese beteiligten Enzyme sollten deshalb in maximaler Menge vorhanden und damit möglicherweise einem optischen Nachweis zugänglich sein. Ein elektrophoretischer Vergleich zwischen unbelichtetem Wildtyp und der Mutante "RD-1" ergibt eine Übereinstimmung in der gewohnten Art. Als Beispiel hierfür wurde in Abb. 21 die 50%-Fraktion ausgewählt. Die beiden Kurven sind zwar nicht in allen Einzelheiten deckungsgleich (die Ursachen sind auf S. 70 bereits beschrieben), doch ließ sich die Übereinstimmung auch hier in mehreren Versuchen mit je 3 Parallelläufen absichern. Entsprechend den Überlegungen, die bei den Nukleinsäureversuchen angestellt wurden, könnte eine hohe spezifische Markierung eines oder mehrerer lichtinduzierter Proteine, die optisch bisher nicht erfaßbar waren, diese gegenüber der Dunkelkontrolle sichtbar machen. Zu diesem Zweck wurde das schon zuvor in der beschriebenen Weise unter "step-down"-Bedingungen verarmte Mycel nach einer Vorbereitungszeit mit ^{14}C -Leucin gefüttert. Die in anfänglichen Versuchen erfolgte Doppelmarkierung mit der damit verbundenen Messung der Radioaktivität von Gelscheibchen hatte sich dabei nicht bewährt; die bei der Zerteilung der Gele in schmale Scheibchen erreichbaren Schichtdicken lagen immer erheblich über den Dimensionen der einzelnen Banden, sodaß sich die Radioaktivität mehrerer Banden vereinigte. Die Autoradiographie mit ^{14}C einfachmarkierter Pherogramme erfordert zwar einen höheren Zeitaufwand, ist aber dank der erarbeiteten Trocknungsmethode in ihrer Auflösung der vorangegangenen elektrophoretischen Trennung ebenbürtig; Abb. 22 verdeutlicht dies am Beispiel der 70%-Fraktion. Aus dieser Abb. geht aber auch hervor, daß eine hohe spezifische Markierung irgendeiner "Licht"-Bande gegenüber der Dunkelkontrolle nicht zu beobachten ist.

Füttert man ^{14}C -Leucin in demselben Versuchsansatz, aber

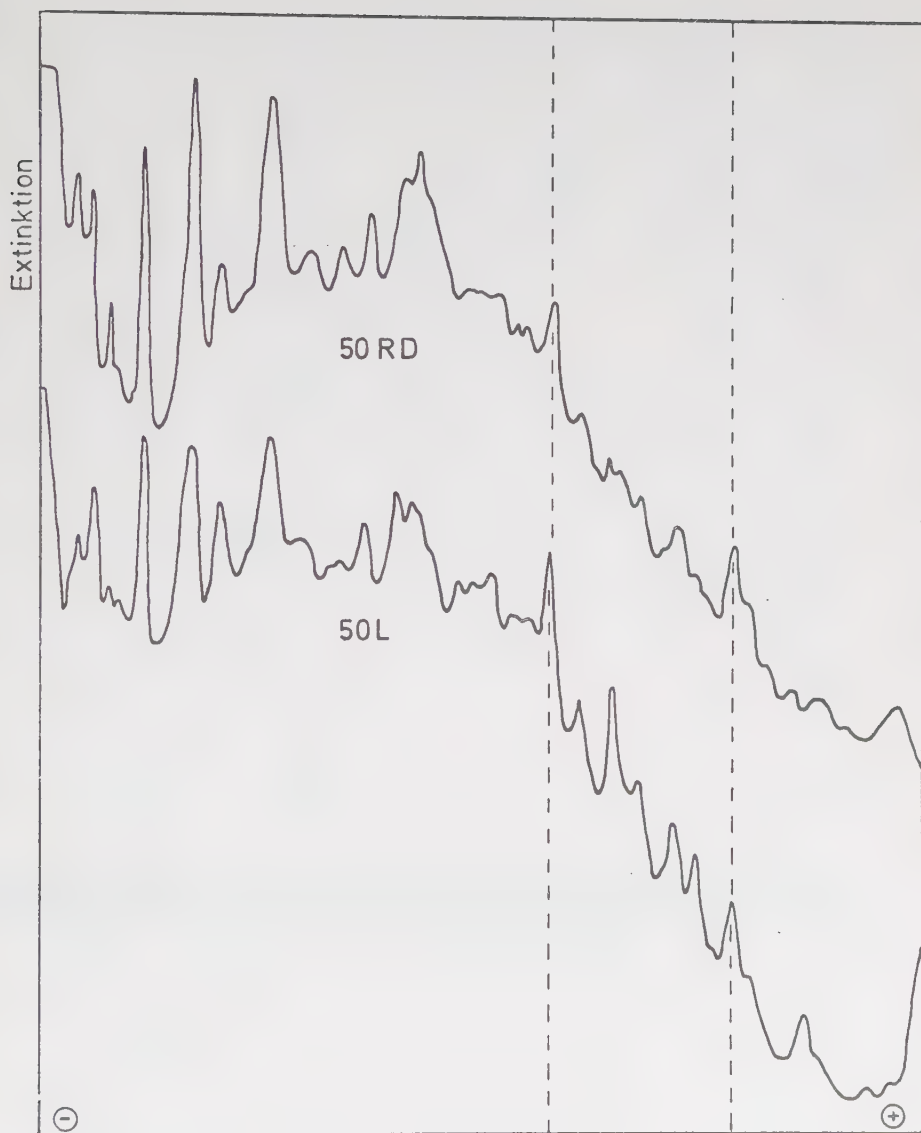


Abb. 21: Wie Abb. 19; RD: Protein aus der Mutante "RD-1".

Extinktion

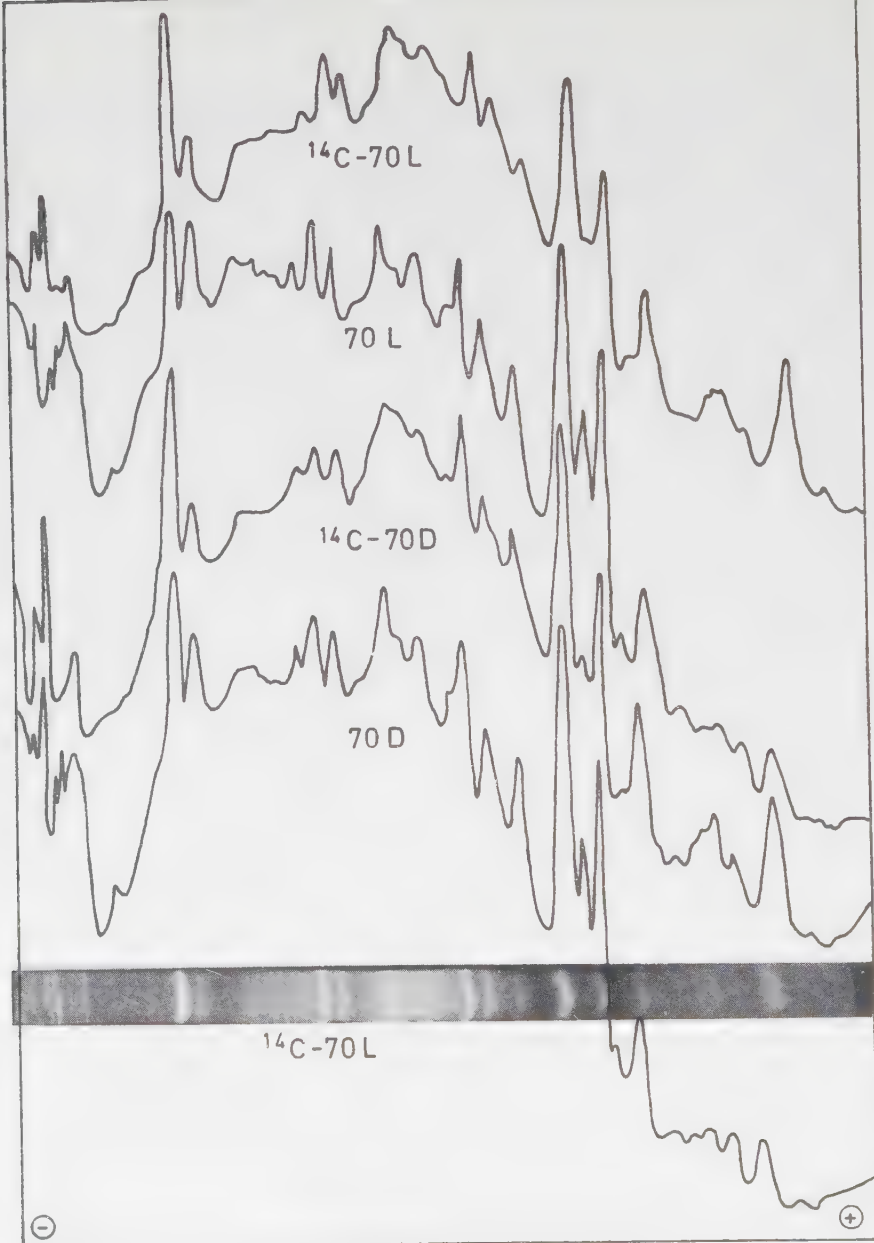


Abb. 22: Wie Abb. 19: Markierung mit U- ^{14}C -Leucin für 3 Std.
 ^{14}C : Radioaktivitätskurve der entsprechenden Fraktion.

unter der Einwirkung von 60 μ M CHI (der Konzentration, die die Carotinoidsynthese gerade vollständig unterdrückt (RAU, 1967b), so ist dennoch eine Proteinsynthese zu beobachten, die sich aber auf wenige Banden beschränkt, deren Radioaktivität zudem geringer ist als bei entsprechenden Proben ohne CHI. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Proteinen um mitochondriale, oder aber es werden in den verschiedenen übrigen Kompartimenten der Zelle unterschiedliche CHI-Konzentrationen erreicht bzw. wirksam.

Bei allen Versuchen dringt ein Teil des radioaktiven Materials nicht in das Gel ein. Dies ist, wie bereits gesagt, bei der zum Teil irreversibel gefällten 40%-Fraktion der Fall; aber auch bei den klaren Fraktionen bleibt Aktivität am Start zurück, die vermutlich in für die Gelporengröße zu voluminösen Molekeln enthalten ist. Es ist dabei auch an Chromoproteide zu denken, da die Proteinlösung aus belichtetem Mycel orange gefärbt ist, und zwar abnehmend mit zunehmender Ammonsulfatkonzentration.

2.3. Die strukturgebundenen Proteine

Wie eingangs erwähnt sind die Carotinoide wahrscheinlich an lipophile Zellstrukturen gebunden. Zumindest bei Bakterien sind sie häufig Bestandteil ihrer Membranen (Lit. siehe KRINSKY, 1971). In *Myxococcus fulvus* z. B. sind sie in Form von Glucosiden gebunden (KLEINIG, 1972). NEUPERT u. LUDWIG (1971) zeigten, daß die äußere Mitochondrienmembran bei *Neurospora crassa* Neurosporaxanthin enthält und daß sich aus dieser Membran ein Protein isolieren läßt, dessen Synthese durch CHI hemmbar ist. Es war nicht Gegenstand dieser Untersuchung, ob diese Synthese lichtabhängig erfolgt und ob dieses Protein gar verantwortlich für die Synthese von Neurosporaxanthin ist. Es kann aber doch vermutet werden, daß die bei der Carotinoidsynthese beteiligten Enzyme strukturgebunden sind. Da aber nicht bekannt ist,

inwieweit der Ort der Carotinoidsynthese zugleich deren Einlagerungsort ist, wurde im folgenden versucht, aus sämtlichen, im wäßrigen System nicht extrahierbaren Strukturen Proteine in Lösung zu bringen.

Extrahiert man das bei 700 g angefallene Sediment mit TMD- und TMB-Puffer (siehe Schema Abb. 18), wobei der Inhalt intakter Zellen nicht angegriffen wird, so erhält man nach der Elektrophorese der erhaltenen Fraktionen "DSD"/"DSL" und "BSD"/"BSL" das in Abb. 23 dargestellte Ergebnis. Es wurde eine Reihe von Proteinen erhalten, die sich mit Puffer P nicht extrahieren ließen. Dabei muß es sich um Proteine handeln, die aus dem Plasmalemma und damit verbunden Strukturen stammen oder aus der Zellwand und der ihr außen aufgelagerten Schleimschicht. Es ist aus der Abbildung zu erkennen, daß Brij 58, das ein aggressiveres Detergens darstellt als DOC, die DOC-Extraktion zuende führt, aber auch neue, bisher nicht extrahierte Proteine isoliert. Die Extraktion ist danach mit SDS, dem schärfsten verwendeten Detergens, nicht mehr zu steigern.

Eine hohe spezifische Markierung einzelner Proteine konnte hier ebensowenig festgestellt werden, wie bei der Extraktion desjenigen Sediments, das bei 40 000 g anfiel (Fraktionen "DÜD"/"DÜL" und "BÜD"/"BÜL"). Hier muß allerdings gesagt werden, daß die elektrophoretische Trennung dieser Fraktionen häufig unscharf und schlecht reproduzierbar war. Für weitere Untersuchungen wäre eine methodische Verbesserung vor allem deshalb notwendig, weil in diesem Sediment die bereits beschriebene orange gefärbte Schicht zu finden ist, die wahrscheinlich die Gesamtmenge der Carotinoide enthält.

Die aus dem Acetonpulver isolierten Proteine stellen sich als eine relativ geringe Anzahl deutlich ausgeprägter Banden dar (Abb. 24). Die Radioaktivität dieser Banden läßt keinen Schluß auf im Licht selektiv oder verstärkt gebildete Prote-

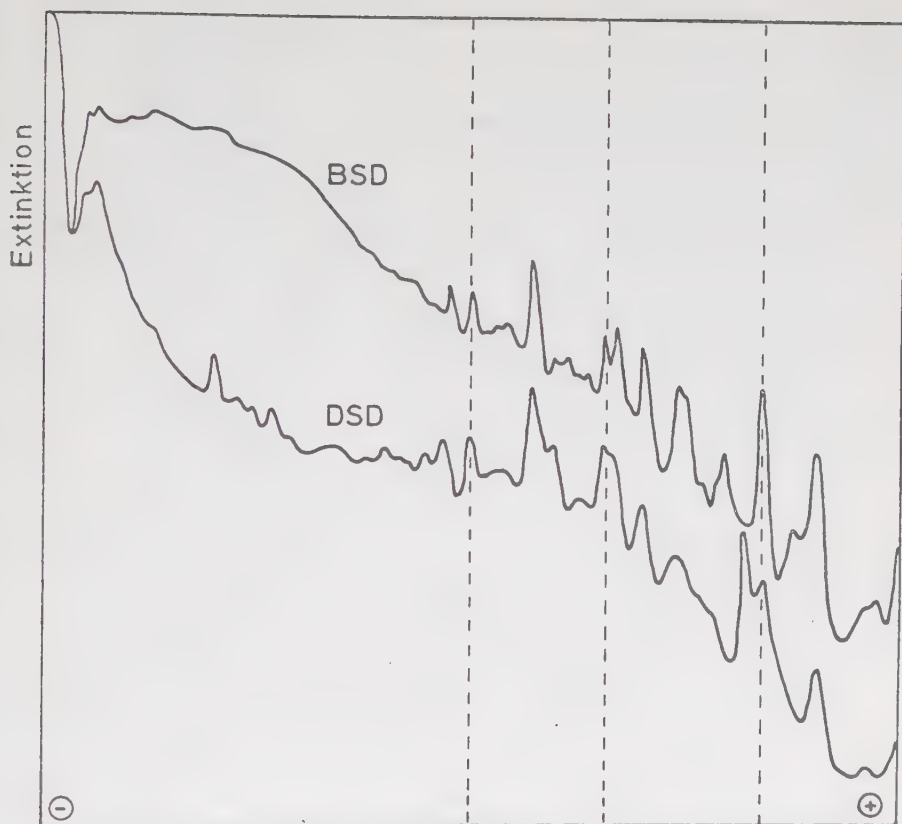


Abb. 23: Disk-Elektrophorese von strukturgebundenen Proteinen aus *Fus. aquaeductum*. DSD: Extraktion mit TMD-Puffer; BSD: Extraktion mit TMB-Puffer. — Absorption.

ine zu; belichtete Proben und Dunkelkontrollen sind in allen Punkten identisch.

Die Elektrophorese der basischen Proteine brachte nur drei Banden zum Vorschein. Bemerkenswert an den in Abb. 25 zusammengefaßten Ergebnissen ist, daß die Bande III nur in der aus belichtetem Mycel erhaltenen Fraktion "7oL" gut ausge-



Abb. 24: Disk-Elektrophorese der aus dem Acetonpulver der belichteten Probe gewonnenen Proteine.
 ^{14}C : Radioaktivitätskurve.

prägt ist. Nach den Ergebnissen der Radioaktivitätsmessung in Markierungsversuchen ist sie jedoch ebenso wie die Banden I und II nicht radioaktiv. Die Synthese der Bande III wird zudem durch 60 μM CHI nicht gehemmt, eine Beteiligung an der Carotinoidsynthese ist demnach nicht wahrscheinlich. Unter Inkubation mit CHI verschwindet vielmehr die Bande II vollständig; sie unterliegt offensichtlich einem hohen turn-

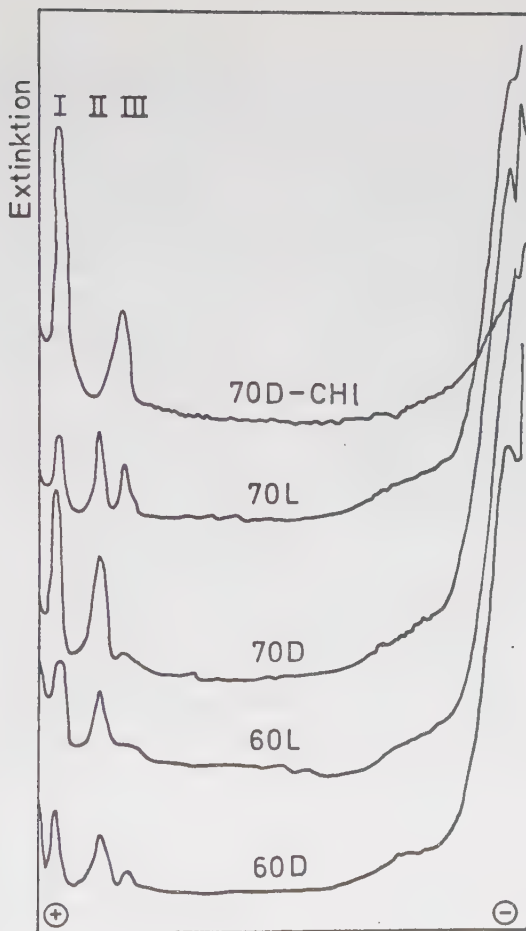


Abb. 25: Disk-Elektrophorese der basischen Proteine, die in den Fraktionen der löslichen Proteinen enthalten sind. CHI: Mycel mit 60 μ M CHI inkubiert.
- Absorption nach Anfärbung.

over, während die Nachsynthese blockiert ist. Bei den Banden I und III dagegen handelt es sich entweder um stabile, vor Zugabe von CHI vorhandene Proteine oder um solche, deren Synthese durch diese CHI-Konzentration nicht gehemmt wird.

Auch durch den Einsatz dieser differenzierten Extraktions- und Trennungsmethoden ist es also nicht möglich, einen Nachweis darüber zu führen, ob eine de-novo-Synthese von spezifischen Proteinen der Carotinoidsynthese vorangeht. Es versteht sich, daß die angewandten Methoden nur eine Auswahl aus der Vielzahl der Möglichkeiten sein konnten. Die Methodik ist zudem erschwert durch die Notwendigkeit, die gesamte Zelle zu untersuchen, da bislang keine gesicherten Kenntnisse darüber vorliegen, in welchen Zellkompartimenten die Carotinoidsynthese lokalisiert ist.

2.4. Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen

Das gleiche Problem belastete von Anfang an unser Vorhaben, neu gebildete Proteine durch immunologische Methoden nachzuweisen. Die Frage war, ob die Verabreichung von Antigenen in Form eines Gesamtextrakts imstande ist, bei den Kaninchen gegen jedes der injizierten Proteine eine Antikörperbildung in ausreichendem Umfang auszulösen, falls bei der gewählten Immunisierungsmethode überhaupt eine Immunreaktion erfolgt.

Die Verträglichkeit auch hoher Proteinkonzentrationen bis zu 120 mg pro Injektion konnte als sehr gut bezeichnet werden. Der erste Test auf den Antikörpertiter im Blut der Kaninchen war positiv. Nach der Doppeldiffusion wurden drei Präcipitationslinien sichtbar (Abb. 26), die natürlich aber keine Antwort auf unsere Fragestellung geben konnten, obwohl dabei zu erkennen ist, daß die Dreizahl nicht immer erreicht wird. Eine Abhängigkeit von der Lichtinduktion besteht jedoch nicht, vielmehr ist der abgebildete Effekt eine Funktion der Antigenkonzentration.

Eine Vorstellung davon, gegen welche Zahl von Antigenen Antikörper gebildet wurden, vermittelt das Ergebnis einer Immunelektrophorese, die in Abb. 27a dargestellt ist. Nach

erfolgter Diffusion der Antikörper gegen den elektrophoretisch getrennten Gesamtextrakt wird deutlich, daß die Zahl der Präcipitationslinien weit geringer ist als die Zahl der Banden, die bei der Disk-Elektrophorese erhalten wurden. Trägt man eine geringere Proteinmenge auf, so erhält man weniger Präcipitationslinien, die von denjenigen Proteinen stammen, gegen die der höchste Antikörpertiter erreicht wurde (Abb. 27b).

Eine Fraktionierung des Gesamtextrakts, wie er in Abschnitt IV.1.2. und -3. erfolgt ist und die damit zusammenhängende Anreicherung

der enthaltenen Proteine, läßt keine neuen Präcipitationsbögen mehr erscheinen, wie die aus dem Acetonpulver isolierten Proteine als Beispiel in Abb. 28 zeigen.

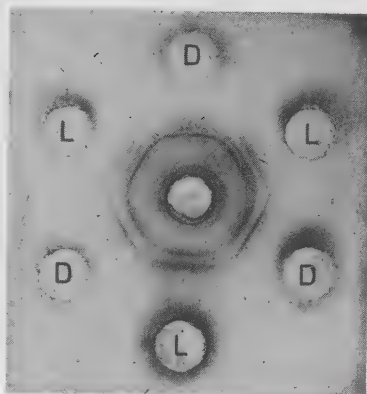


Abb. 26: Immunodoppeldiffusion von "Licht"-Antikörpern (im zentralen Loch) gegen "Licht"- und "Dunkel"-Antigen (L bzw. D).

Aus den Abbildungen wird aber deutlich, daß die beiden Kaninchen nicht gleichwertig auf die verabreichten Antigene reagiert haben. Immer ist zu beobachten, daß "Licht"-Antigen zusammen mit "Dunkel"-Antikörpern mehr Präcipitationslinien ergeben als "Licht"-Antigen mit "Licht"-Antikörpern. Alle auf den ersten Blick augenfälligen Unsymmetrien in den Phorogrammen sind auf diese Tatsache zurückzuführen und nicht auf die Folgeprodukte einer Lichtinduktion. Diese müßten sichtbar werden im Vergleich zwischen "Licht"-Antigen und "Dunkel"-Antigen gegenüber den "Licht"-Antikörpern.

Falls lichtbedingte Unterschiede verdeckt bestehen sollten, müßte ein Versuch zum Ziel führen, der auf der folgenden

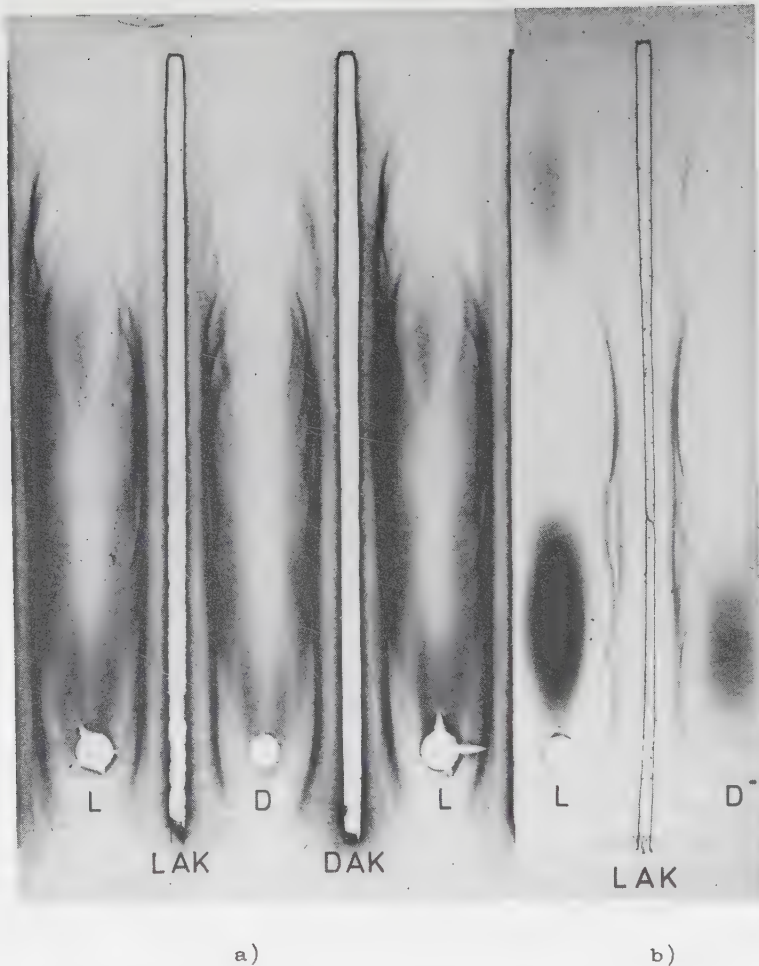


Abb. 27: Immunelektrophorese der Gesamtproteine aus *Fus. aquaeductuum*. a) 3 μ l, b) 1 μ l "Licht"- (L) bzw. "Dunkel"-Antigen (D) in den Löchern aufgetragen (30 mg/ml); "Licht"- bzw. "Dunkel"-Antikörper in Rinnen (LAK bzw. DAK).

Überlegung basiert: versetzt man "Licht"-Antigen mit einem Überschuß an "Dunkel"-Antikörpern und läßt beide zu einer quantitativen Präcipitation kommen, so sollten nur noch die durch Licht induzierten Antigene im Überstand verbleiben. Unterzieht man diese einer Immunoelktrophorese, müßten allein sie sich als Präcipitationsbögen manifestieren. Es erübrigt sich, das Ergebnis eines solchen Versuchs darzustellen, weil die Probe ebensowenig Präcipitate erkennen ließ wie die mit "Dunkel"-Antigen durchgeführte Kontrolle. Den eingangs dieses Abschnitts dargelegten Erwägungen zur Folge bedeutet dieser negative Befund jedoch keineswegs, daß nach der Lichtinduktion der Carotinoid-synthese keine de-novo-Synthese von Proteinen stattfindet. Ein an anderer Stelle bereits angedeuteter Gesichtspunkt kommt noch hinzu: wenn die bei der Dunkel-synthese der Carotinoide beteiligten Enzyme identisch mit denen im Licht gebildeten sind, dann müßten beide Antikörperpräparationen qualitativ gleich sein; lediglich durch unterschiedliche Mengenverhältnisse könnten dann noch Differenzen zustande kommen. Nimmt man dagegen das von THEIMER (1968) diskutierte Isoenzymasystem im Dunkeln einerseits und nach Lichtinduktion andererseits als gegeben an, wobei beide nebeneinander vorhanden sein könnten, dann wäre die Beantwortung der Frage entscheidend, ob diese Isoenzyme verschiedene Antigene darstellen.

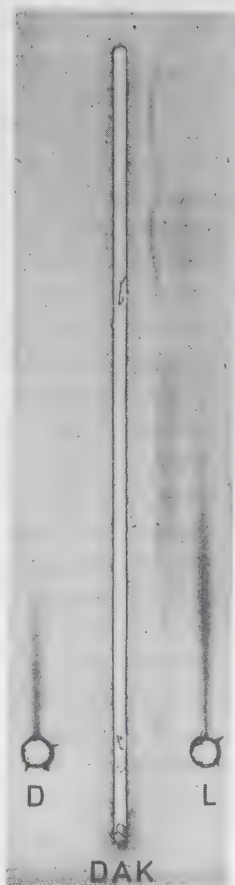


Abb. 28: Immunoelktrophorese der aus Acetonpulver isolierten Proteine.

I. Hinsichtlich der Photoregulation der Carotinoidsynthese verhält sich *Fus. oxysporum* wie die bisher bekannten Pilzarten mit lichtabhängiger Farbstoffbildung. *Fus. oxysporum* synthetisiert zwar abweichend von *Fus. aquaeductuum*, *Neurospora crassa*, *Verticillium agaricinum* (VALADON u. MUMMERY, 1971) und *Cephalosporium diospyri* (SEVIOUR u. CODNER, 1973) als Pigmente nicht nur Carotinoide, sondern daneben noch – allerdings nicht photoreguliert – Naphtochinone. Die Synthese dieser Naphtochinone ist abhängig von den Ernährungsbedingungen, eine Erscheinung, die auch beim Hausschwamm (*Serpula lacrimans*) mit anderen Farbstoffen beobachtet werden kann (BRESINSKY, 1973). Die Lichtabhängigkeit der Carotinoidsynthese von *Fus. oxysporum* zeigt nach den vorliegenden Ergebnissen ähnliche Charakteristika, wie sie bei *Fus. aquaeductuum* ermittelt wurden (RAU, 1967a): Die zur Erzielung etwa der gleichen Farbstoffausbeute benötigte Lichtmenge, die Länge der lag-Phase und der Verlauf der Farbstoffbildung bis zu ihrem Abschluß, sowie die Tatsache, daß sich die Lichtreaktion nicht sättigen läßt, stimmen bei beiden Pilzen ziemlich genau überein. Dies kann als Anhaltspunkt dafür gewertet werden, daß zumindest in diesen beiden Organismen der Mechanismus der Regulation derselbe ist.

Die photoregulativen Merkmale von *Fus. oxysporum* sind zudem ein weiterer Hinweis dafür, daß es sich bei der Lichtabhängigkeit der Carotinoidsynthese bei Pilzen nicht um seltene Ausnahmefälle handelt, sondern daß eine solche Photoregulation ein verbreitetes Phänomen ist.

II. Der Einsatz von Transkriptionsgiften ist für das in der Einleitung dargestellte Ziel dieser Untersuchungen nur dann sinnvoll, wenn damit eine totale Hemmung der Carotinoidsynthese erzielt werden kann; nur wenn der Nachweis erbracht

ist, daß ein diesbezüglich wirksamer Antimetabolit primär die Neusynthese von RNS vollständig unterbindet, kann ihr Einsatz bei der Suche nach einer lichtabhängigen de-novo-Synthese von m-RNS Erfolg versprechen. Die gängigen unter den zur Auswahl stehenden Antimetabolite haben nicht die geforderte vollständige Hemmung der Carotinoidsynthese gezeigt. Proflavin bewirkte zwar eine solche Hemmung, jedoch wurde deutlich, daß Proflavin nicht die Transkription, sondern den Photorezeptor beeinflußt. Die Alternative, in dem Angebot bekannter, aber nicht näher charakterisierter Antibiotika weiterzusuchen, wurde zugunsten der ausichtsreicheren Möglichkeit zurückgestellt, die mit der lichtinduzierten Carotinoidsynthese gekoppelten Veränderungen innerhalb der Nukleinsäuren direkt nachzuweisen.

III. Neuere Arbeiten, die sich mit der phytochromgesteuerten Morphogenese (DITTES u. MOHR, 1970), der Auxinwirkung (SCHRAUDOLPH, pers. Mitt.) oder der Lichtwirkung auf ergrünende Maisblätter befaßten (HAREL u. BOGORAD, 1973), konnten ebensowenig wie die hier vorliegende Untersuchung mit Hilfe einer Auftrennung der Nukleinsäuren an der MAK-Säule nach radioaktiver Markierung Unterschiede im Sinne einer differentiellen Genaktivierung nachweisen. Unser negativer Befund ist umso schwerwiegender, als wir wahrscheinlich eines der im Bereich der eukaryotischen Pflanzen für solche Untersuchungen aussichtsreichsten Systeme zur Verfügung hatten (siehe Einleitung) und über alle bisherigen Untersuchungen hinaus weitere Methoden angewendet haben, die zum Teil eine Anreicherung von m-RNS erwarten ließen. Eine dieser Methoden, die Affinitätschromatographie, hat zu — zwar vorläufigen — Anhaltspunkten geführt, die einen Ansatz für weitere Untersuchungen liefern.

Der damit erhaltene Hinweis, daß bei der Photoinduktion der Carotinoidsynthese wohl doch de-novo-Synthesen beteiligt sind, sich dafür aber bei der Auftrennung mit Hilfe von

MAK-Säulen keine Anhaltspunkte ergaben, lassen zusammen mit Befunden an Seeigeleiern (KEDES u. BIRNSTIEL, 1971), bei der Synthese von Hämoglobin in Reticulocyten (Lit. siehe PEMBERTON u. BAGLIONI, 1972), von Histonen in HeLa-Zellen (BORUN et al., 1967), von Immunglobulin in Tumorzellen (MACH et al., 1973) und von Ovalbumin im Hühneroviduct (PALACIOS et al., 1973), die alle der m-RNS Sedimentationskonstanten von 7-10 S, 14 S bzw. 18 S zuschreiben, die Vermutung aufkommen, daß langezeit bei der MAK-Säule an der falschen Stelle (Schulter der h-rRNS) nach der m-RNS gesucht wurde, falls nicht die Basenzusammensetzung der m-RNS ausschlaggebend für ihr Trennverhalten ist. Andererseits zeigen auch die vorliegenden Ergebnisse in den übrigen Fraktionen der MAK-Säule keine signifikante, in Beziehung zur Photoinduktion spezifische Radioaktivität.

Aus den weit gefächerten Kettenlängen der zu codierenden Proteine ist an sich die in den oben genannten Befunden sich widerspiegelnde Vielfalt der m-RNS-Größen zu erwarten. Für die Seidenfibroin-m-RNS in *Bombyx mori* wurde sogar eine Sedimentationskonstante zwischen 45 S und 65 S ermittelt. (SUZUKI u. BROWN, 1972), ein Wert, der bisher in keinem Fall von einer "schnell markierten RNS" erreicht wurde. Sprüche in den betreffenden Untersuchungen (siehe Einleitung) der Adenin-Reichtum der "schnell markierten RNS" nicht dagegen, könnte man annehmen, daß es sich jeweils nur um hochmolekulare Vorstufen der r-RNS handelte, ähnlich unseren Ergebnissen nach CHI-Induktion. Durch CHI wurden in unseren Versuchen wahrscheinlich r-RNS-Vorstufen angehäuft (Lit. über die Synthese der r-RNS siehe ATTARDI u. AMALDI, 1970), weil durch die Hemmung der Proteinsynthese keine ribosomalen Proteine für die Fertigstellung der Ribosomen bereitstehen.

Man gewinnt bei der Sichtung der an den Nukleinsäuren gewonnenen Ergebnisse den Eindruck, daß die gebildete m-RNS-

Menge so gering ist, daß sie sich in vielen Methoden einem Nachweis entzieht. Selbst wenn es mit Hilfe der Affinitätschromatographie gelänge, die m-RNS der Zelle zu isolieren, würden bei deren Chromatographie wohl dieselben bereits an früherer Stelle diskutierten Probleme wie bei der Chromatographie der Gesamt-RNS auftreten. Ließe sich aber eine hohe spezifische Markierung einer oder mehrerer RNS-Spezies darstellen, so müßte erst nach Methoden gesucht werden, um den Nachweis ihrer Beteiligung an der Carotinoidsynthese zu führen; im Augenblick besteht nämlich noch keine Möglichkeit zum Bio-Test; weil die Enzyme der Carotinoidsynthese noch nicht bekannt sind und daher keine enzymologischen und immunologischen Nachweismethoden vorhanden sind.

Stellt man die differentielle Genaktivierung als Mechanismus für unser vorliegendes Photoinduktionssystem in Frage, dann ergibt sich die Forderung nach möglichen Alternativen. Anthropomorph betrachtet, besteht für den Wasserpilz *Fus. aquaeductum*, aber auch für *Fus. oxysporum* und *Neurospora crassa* die Erwartung, im Regelfall photoinduziert zu werden. Wie sinnvoll ist dann eine Regulation auf der Stufe der Transkription? Ökonomischer erschiene ein Verfahren ähnlich dem der vorgebildeten, aber maskierten und damit unwirksamen m-RNS in Weizenembryonen (MARCUS u. WEEKS, 1971) oder in unbefruchteten Seeigelleiern (FARQUHAR u. MCCARTHY, 1973). Eine Entscheidung zwischen den verschiedenen Alternativen könnte sich möglicherweise durch die weitere Untersuchung der in der vorliegenden Arbeit erbrachten Anhaltspunkte ergeben.

IV. Betrachtet man die Ergebnisse, die bei der Suche nach einer Neuinduktion von Proteinen in *Fus. aquaeductum* erzielt wurden, dann drängen sich entsprechende Schlußfolgerungen auf, wie sie im Fall der Nukleinsäuren bereits getroffen wurden: Bleibt man aufgrund der in früheren Arbeiten an *Fus. aquaeductum* (siehe Einleitung) gewonnenen Daten bei dem Vorlie-

gen einer Genaktivierung als Mechanismus der Photoregulation, dann spielen sich auch innerhalb der Proteine die Veränderungen unterhalb der Nachweisgrenze ab; auch immunologische Methoden helfen solange nicht weiter, als die an der Carotinoidsynthese beteiligten Enzyme nicht näher lokalisiert werden können.

Allgemein standen die Untersuchungen unter dem Nachteil der Notwendigkeit, die gesamten Proteine der Zelle mit in die Experimente einzubeziehen, da wie gesagt weder die an der Carotinoidsynthese beteiligten Enzyme noch der Ort der Synthese bekannt sind. Dieser Nachteil machte sich vor allem in den immunologischen Experimenten bemerkbar; die Immunreaktion der Kaninchen beschränkte sich im Vergleich zu der großen Zahl von Banden bei der gelelektrophoretischen Auftrennung auf nur wenige Proteine, die wohl in der Gesamtmenge den größten Anteil einnahmen. Eine Reaktion auf eine nur in geringen Mengen vorhandene Protein-Spezies war nicht mehr zu erkennen. Dieses Ergebnis ist zwar keine Überraschung, zeigt aber ganz eindeutig, daß nur eine Anreicherung der carotinoidbildenden Enzyme, möglicherweise über eine Ermittlung und Isolierung der Zellkompartimente, in denen die Carotinoidsynthese abläuft, zu entscheidenden Resultaten führen kann.

Setzt man nämlich die Menge der unter den entsprechenden Bedingungen gebildeten Carotinoide in Beziehung zum Trockengewicht der Zelle, so gelangt man trotz der vorhandenen hohen Farbsintensität des Mycels lediglich in Größenordnungen von 0,1 %; zudem hat der Pilz zur Synthese dieser vergleichsweise geringen Menge 24 Std. Zeit (LANG, 1969). Es wäre also denkbar, daß einige wenige m-PNS-Moleküle genügen, um mit hinreichender Lebensdauer eine kleine Anzahl von Enzymmolekülen zu produzieren, die dann bei entsprechend hoher Wechselzahl "bequem" die Carotinoidsynthese vollziehen könnten.

1. Bei der Regulation der pflanzlichen Entwicklung durch Licht wird als Mechanismus von Photoinduktionen eine differentielle Genaktivierung mit de-novo-Synthese von Enzymen angenommen. Es ist jedoch bisher in keinem Fall gelungen, die Beteiligung einer spezifischen RNS an der Photoinduktion direkt nachzuweisen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, bei der lichtabhängigen Carotinoidsynthese von Pilzen solche Veränderungen indirekt und vor allem auch direkt nachzuweisen. Dieses Photoregulationssystem ließ gegenüber den bisher untersuchten Fällen folgende Vorteile erwarten: Kurze Induktions- und Reaktionszeiten; zeitliche Trennung der ablaufenden Teilprozesse; Anwendungsmöglichkeit von "step-down"-Bedingungen.
2. Als Grundlage für die geplanten Versuche sollte neben *Fus. aquaeductum* und *Neurospora crassa* noch nach einem weiteren Pilz mit lichtabhängiger Carotinoidsynthese gesucht werden. Für *Fus. oxysporum* wurden deshalb die Wachstumsbedingungen für Submerskultur ermittelt, sowie die Art der gebildeten Carotinoide und die Beziehungen zwischen Lichtinduktion und Carotinoidsynthese untersucht. *Fus. oxysporum* verhält sich im Bezug auf letzteres sehr ähnlich wie *Fus. aquaeductum*.
3. Die Versuche, mit Hilfe von Transkriptionsgiften der Klärung der Frage näherzukommen, ob in den Prozeß der photoinduzierten Carotinoidsynthese eine differentielle Genaktivierung eingeschaltet ist, verliefen negativ, weil mit keinem der gängigen Antimetabolite eine Blockierung der Carotinoidsynthese erreicht werden konnte. Proflavin hemmt zwar, doch beeinflußt es nicht die Transkription, sondern den Photorezeptor. Es mußte deshalb versucht werden, mögliche differentielle Genaktivitäten direkt nachzuweisen.

4. Es konnte eine Extraktionsmethode für Nukleinsäuren ausgearbeitet werden, die für eine allgemeine Verwendung geeignet erscheint, da sie in *Fus. oxysporum*, *Fus. aquaeductuum*, *Neurospora crassa*, sowie *Euglena gracilis* gleichwertige Ergebnisse lieferte.
5. Doppelmarkierung des unter "step-down"-Bedingungen induzierten Mycels zeigt bei Chromatographie seiner Nukleinsäuren an MAK-Säulen eine Koinzidenz der Radioaktivitätskurven von belichteter Probe und Dunkelkontrolle mit der UV-Absorptionskurve; auch die Variation von Markierungsdauer und -zeitpunkt, sowie Belichtungsdauer und Lichtintensität (um das Optimum einer eventuellen m-RNS-Synthese zu erfassen) machte keine lichtbedingten Unterschiede sichtbar. In der TB-RNS, die vielfach aufgrund ihres Adenin-Reichtums als m-RNS diskutiert wird, werden ebenfalls keine photoinduzierten Veränderungen erkennbar.
6. Die bei *Fus. aquaeductuum* zu beobachtenden Gedächtnisphänomene gaben Anlaß zu dem Versuch, mit Hilfe einer Hemmung der Proteinsynthese durch Cycloheximid (CHI) m-RNS anzureichern. Nukleinsäuren aus Mycel unter CHI-Inkubation zeigten auf den MAK- und BPAK-Säulen an der hochmolekularen Schulter der h-rRNS einen zusätzlichen Gipfel, der im Verhältnis stark markiert ist, allerdings wiederum ohne Unterschied zwischen Lichtprobe und Dunkelkontrolle. Es wird vermutet, daß es sich bei dieser mit der höchsten spezifischen Markierung versehenen RNS-Spezies um die 32 S-Vorstufe der r-RNS handelt, die sich deshalb anhäuft, weil durch die Hemmung der Proteinsynthese die ribosomalen Proteine zur Fertigstellung der Ribosomen nicht bereitstehen.
7. Die Disk-Elektrophorese trennt die beiden Hauptkomponenten der r-RNS von *Fus. aquaeductuum* (Sedimentationskonstanten von 18 S und 25 S, entsprechend den von höheren Pflanzen). Außer der 4 S RNS (t-RNS) und der ribosomalen 5 S RNS tren-

nen sich zwei weitere Banden ab, die als 32 S bestimmt, bzw. als DNS identifiziert wurden.

8. Für diese Versuche wurde eine Trocknungsmethode für Acrylamidgele entwickelt, die das bislang nur schwer vermeidbare Schrumpfen der Gele beim Trocknungsvorgang zuverlässig verhindert und eine hochauflösende Autoradiographie gestattet.
9. Aus *Fus. aquaeductuum* konnten Polysomen isoliert werden, die sich im Saccharosegradienten aus bis zu sechs abzählbaren Ribosomen auf dem m-RNS-Strang darstellen. Bei Inkubation des Pilzes mit CHI können deutlich vermehrt Polysomen isoliert werden, gleichlaufend mit einer Abnahme der Monosomen. Es wird vermutet, daß ein stabiler m-RNS-Ribosom-CHI-Komplex gebildet wird, der die m-RNS konserviert. Extrahiert man die Polysomen mit Phenol, so zeigt das Elutionsprofil ihrer MAK-Chromatographie ohne Inkubation mit CHI eine ähnliche Dreigipfligkeit des r-RNS-Bereichs wie bei der Trennung von Gesamtnukleinsäuren aus Zellen nach Behandlung mit CHI. Aus den Polysomen wurde die m-RNS mit Hilfe von EDTA als m-RNP freigesetzt. Nach der Phenolextraktion dieses Nukleoproteinkomplexes zeigt die Disk-Elektrophorese im Bereich von 8 - 16 S eine Vielzahl neuer Banden, die aber keine signifikant höhere spezifische Aktivität aufweisen. Die Anreicherung von m-RNS, die mit den Polysomen erzielt werden sollte, führte nicht zu einer Annäherung an die Lösung der anstehenden Probleme.
10. Mit Hilfe der Affinitätschromatographie der Nukleinsäuren an Nitrozellulosefiltern wurde erstmals ein direkter Hinweis dafür gewonnen, daß durch eine Photoinduktion eine spezifische RNS neu synthetisiert wird; um dieses ermutigende vorläufige Ergebnis abzusichern, sind weitere Untersuchungen mit verbesserter Methodik erforderlich.

11. Bei der Extraktion der Proteine aus dem Mycel wurde festgestellt, daß die belichtete Probe bis zu 50 % weniger Protein lieferte als die Dunkelkontrolle; die mikroskopische Untersuchung der Homogenate zeigte, daß die belichtete Probe noch einen Großteil intakter Zellen enthielt, die auch durch drastisch verlängerte Homogenisation nicht aufgeschlossen wurden. Offensichtlich wird die Struktur der Zelle durch Belichtung dahingehend verändert, daß sie eine größere mechanische Festigkeit erhält.

12. In den durch fraktionierte Ammonsulfatfällung gruppierten löslichen Proteinen sind mittels der Disk-Elektrophorese auf 7,5%igem Acrylamid auch gegenüber einer mit CMI inkubierten Dunkelkontrolle keine de-novo synthetisierten Proteine nachweisbar. Die strukturgebundenen Proteine wurden fraktioniert extrahiert und dabei eine Vielzahl neuer Banden erhalten; eine lichtbedingte hohe spezifische Markierung einzelner Proteine konnte aber ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Unter den basischen Proteinen wurden drei Banden gefunden, deren eine in ihrer Ausprägung zwar lichtabhängig zu sein scheint, die aber weder CMI-hemmbar noch radioaktiv markiert ist; eine Beteiligung an der Carotinoidsynthese ist demnach auszuschließen.

13. Durch Applikation des Gesamtproteinextrakts aus *rus. aqueductuum* an Kaninchen gelang es, eine Immunreaktion auszulösen und Antikörper zu erhalten; in der Immunoelktrophorese erschienen aber weit weniger Präcipitationslinien als der Zahl der Banden, die bei der Disk-Elektrophorese sichtbar wurden, entspricht. Es wurden also wohl nur gegen die anteilstärksten Proteine Antikörper in erfaßbaren Mengen gebildet. Eine quantitative Immunoprecipitation von "Licht"-Antigenen mit "Dunkel"-Antikörpern, nach der nur noch die durch Licht induzierten Proteine im Überstand vorhanden sein sollten, erbrachte in der darauffolgenden Immunoelktrophorese gegen "Licht"-Antikörper keine Präcipitationsbögen.

14. Es wird diskutiert, daß die als Folge der Photoinduktion neu gebildeten Mengen an m-RNS und Enzymen so gering sind, daß sie sich bei den bisher angewandten Methoden (wahrscheinlich mit Ausnahme der Affinitätschromatographie der Nukleinsäuren) einem Nachweis entzogen haben. Bezüglich der Proteine wird festgestellt, daß nur eine Anreicherung der carotinoidbildenden Enzyme, möglicherweise über eine Ermittlung und Isolierung der Zellkompartimente, in denen die Carotinoïdsynthese abläuft, zu entscheidenden Resultaten führen kann.

- AASEN, A.J. and S.L. JENSEN: Acta Chim Scand. 19, 1843 (1965).
- ADESNIK, M., M. SALDITT, W. THOMAS and J.E. DARNELL: J. Mol. Biol. 71, 21 (1973).
- ATTARDI, G. and F. AMALDI: Ann. Rev. Biochem. 39, 183 (1970).
- BATRA, P.P. and H.C. RILLING: Arch. Biochem. 107, 485 (1964).
- BECAREVIC, A. et al.: Febs 29, 164 (1973).
- BECKER, H.J.: Chromosoma 10, 654 (1959).
- BELLAMY, A.R.: Biochim. Biophys. Acta 123, 102 (1966).
- and R.K. RALPH: In: Methods in Enzymology XII B, p. 156 (1968).
- BERGMAN, K. et al.: Bact. Rev. 33, 99 (1969).
- BERNATH, P. and T.P. SINGER: In: Methods in Enzymology V, p. 606 (1962).
- BINDL, E.: Dissertation, Universität München, (1968).
- W. LANG und W. RAU: Planta 94, 156 (1970).
- BLAMIRE, J., D.B. FINKELSTEIN and J. MARMUR: Biochem. 11, 48 (1972b).
- BLOBEL, G.: Proc. Nat. Ac. Sci. U.S.A. 68, 832 (1971).
- BONNER, J., A. SANDOVAL, Y.W. TANG and L. ZECHMEISTER: Arch. Biochem. 10, 113 (1946).
- BORUN, T.W., M.D. SCHARFF and E. ROBBINS: Proc. Nat. Ac. Sci. U.S.A. 58, 1977 (1967).
- BRANDT, E.E. and A.G. DeBUSK: Neurospora Newsl. 6, 17 (1964).
- BRAWERMAN, G., J. MENDECKI and S.Y. LEE: Biochem. 11, 637 (1972).

- BRESINSKY, A.: Z. Naturforsch. 28c, 627 (1973).
- BROWNLIE, G.G. et al.: Nature N. B. 244, 236 (1973).
- BUCK, L.: Zulassungsarbeit, Universität München (1972).
- CARLILE, M.J.: J. Gen. Microbiol. 14, 643 (1956).
- CHROBOCZEK, H. and J.H. CHERRY: Biochem. Biophys. Res. Comm. 20, 774 (1965).
- DAVIES, D.H.: In: GOODWIN, T.W. (Ed.), Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Ac. Press, pp. 165-167 (1965).
- DITTES, H. und H. MOHR: Z. Naturforsch. 25b, 708 (1970).
- DUTTA, S.K. and N. RICHMAN: Neurospora News1. 10, 26 (1966).
- ELLEM, K.A.O.: J. Mol. Biol. 20, 283 (1966).
- and J.W. SHERIDAN: Biochem. Biophys. Res. Comm. 16, 505 (1964).
- FARQUHAR, M.N. and B.J. McCARTY: Biochem. Biophys. Res. Comm. 53, 515 (1973).
- FEDORCSAK, I, A.T. NATARAJAN and L. EHRENBERG: Europ. J. Biochem. 10, 450 (1969).
- FEULNER, J.: Dissertation, Universität München (1969).
- FIRTEL, R.A., A. JACOBSON and H.F. LODISH: Nature N. B. 239, 225 (1972).
- FORRESTER, J.T., P. NAGLEY and A.W. LINNANE: Febs 11, 59 (1970).
- FRASER, R.S.S. and U.E. LOENING: Eur. J. Biochem. 34, 153 (1973).
- GEIGER, P.J. and S.P. BESSMAN: Anal. Biochem. 49, 467 (1972).
- GIELKENS, A.L.J., T.J.M. BERNIS and H. BLOEMENDAL: Eur. J. Biochem. 22, 478 (1971).
- GOODWIN, T.W.: Biochem. J. 62, 346 (1956).

- GOODWIN, T.W.: In: PEACH, K. and M.V. TRACEY (Ed.), *Modern Methods in Plant Analysis*, Vol. III, pp. 272 - 311. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955).
- GREENBERG, J.R. and R.P. PERRY: *J. Mol. Biol.* 72, 91 (1972).
- GROSSBACH, U.: In: MAURER, H.R., *Disk-Elektrophorese*, p. 74 (1968).
- HARDING, R.W. and H.K. MITCHELL: *Arch. Biochem. Biophys.* 128, 814 (1968).
- HAREL and L. BOGORAD: *Plant Physiol.* 51, 10 (1973).
- HENNIG, W., W. KUNZ, B. SCHNIEDERS und K. WILLIAMS: *Z. Naturforsch.* 26b, 235 (1971).
- HESS, D.: *Planta* 61, 73 (1964).
- *Z. Pflanzenphysiol.* 54, 356 (1966).
- HOCK, B. and H. BEEVERS: *Z. Pflanzenphysiol.* 55, 405 (1966).
- ISLER, O. und SCHUDEL: In: LANG, K. (Ed.), *Carotine und Carotinoide*. Steinkopff-Verlag, Darmstadt (1963).
- JACOB, F. and J. MONOD: *J. Mol. Biol.* 3, 318 (1961).
- JARVIS, D., R. LOESER, P. HERRLICH und R. RÖSCHENTHALER: *J. Chrom.* 52, 158 (1970).
- JOHNSON, R.: *Biochem. J.* 119, 699 (1970).
- KARRER, P. und E. JUCKER: *Carotinoide*. Birkhäuser-Verlag, Basel (1948).
- und J. RUTSCHMANN: *Helvet. Chim. Acta* 29, 355 (1946).
- KEDES, L.H. and M.L. BIRNSTIEL: *Nature N. B.* 230, 165 (1971).
- KEY, J.L. and J. INGLE: *Proc. Nat. Ac. Sci. U.S.A.* 52, 1382 (1964).
- KIRBY, K.S.: *Biochem. J.* 100, 532 (1966).
- KLEINIG, H.: *Biochim. Biophys. Acta* 274, 489 (1972).
- KOTHARI, R.M., V. SHANKAR and M.W. TAYLOR: *J. Chrom.* 70, 341 (1972).

- KRINSKY, N.J.: In: ISLER, O., Carotinoide. Birkhäuser-Verlag, Basel und Stuttgart (1971).
- KUHN, R. und H. BROCKMANN: Ber. Dtsch. Chem. Ges. 66, 407 (1933).
- LABRIE, F.: Nature 221, 1217 (1969).
- LANG, W.: Dissertation, Universität München (1969).
- und W. RAU: Planta 106, 345 (1972).
- LEE, S.Y. and G. BRAWERMAN: Biochem. 10, 510 (1971).
- LERMAN, L.S.: Biochim. Biophys. Acta 18, 132 (1955).
- LOENING, U.E.: Biochem. J. 102, 251 (1967).
- LOESER, R., R. RÖSCHENTHALER und P. HERRLICH: Biochem 9, 2364 (1970).
- LOVETT, J.S. and J.A. HASELBY: Arch. Mikrobiol. 80, 191 (1971).
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL: J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).
- MACH, B., C. FAUST and P. VASSALLI: Proc. Nat. Ac. Sci. U.S.A. 70, 451 (1973).
- MANDELL, J.D. and A.D. HERSHEY: Anal. Biochem. 1, 66 (1960).
- MARCUS, A. and D.P. WEEKS: Biochem. J. 124, 6P (1971).
- MARMUR, J.: J. Mol. Biol. 3, 208 (1961).
- MAURER, H.K.: Disk-Elektrophorese. Walter de Gruyter & Co, Berlin (1968).
- NASH, H.A., F.W. QUACKENBUSH and J.W. PORTER: J. Am. Chem. Soc. 70, 3613 (1948).
- NEUPERT, W. und G.D. LUDWIG: Eur. J. Biochem. 19, 523 (1971).
- ODA, K-J. and W.K. JOKLIK: J. Mol. Biol. 27, 395 (1967).
- OUCHTERLONY, Ø.: Arkiv Kemi 1, 43 (1949).
- PALACIOS, R. et al.: J. Biol. Chem. 248, 540 (1973).

- PARISH, J.H. and K.S. KIRBY: *Biochim. Biophys. Acta* 129, 554 (1966).
- PEACOCK, A.C. and C.W. DINGMAN: *Biochem.* 7,668 (1968).
- PEMBERTON, R.E. and C. BAGLIONI: *J. Mol. Biol.* 65, 531 (1972).
- RAU, W.: *Planta* 72, 14 (1967a).
- *Planta* 74, 263 (1967b).
 - *Planta* 101, 251 (1970).
 - und C. FERNBERGER: *Arch. Mikrobiol.* 32, 423 (1959).
 - L. LINDEMANN und A. RAU-HUND: *Planta* 80, 309 (1968).
- RAVEN, H.W.: *Biochemisches Taschenbuch*. Vol. I, 2. Aufl. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1964).
- RILLING, H.C.: *Biochim. Biophys. Acta* 60, 548 (1962).
- RUPPEL, H.G.: *Z. Naturforsch.* 23b, 997 (1968).
- SCHOPFER, P. und B. HOCK: *Planta* 96, 248 (1971).
- SCHUTZ, G., M. BEATO and P. FEIGELSON: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 49, 680 (1972).
- SCHWARTZ, T., E. CRAIG and D. KENNEL: *J. Mol. Biol.* 54, 299 (1971).
- SEITZ, U. und G. RICHTER: *Planta* 92, 309 (1970).
- SEVAG: *J. Biol. Chem.* 124, 425 (1938).
- SEVAG and CORNER: *J. Gen. Microbiol.* 77, 403 (1973).
- SHELDON, R., C. JURALE and J. KATES: *Proc Nat. Ac. Sci. U.S.A.* 69, 417 (1972).
- SOLYMOSY, F., I. FEDORCSAK, A. GULYAS, G.L. FARKAS and L. EHRENBERG: *Eur. J. Biochem.* 5, 520 (1968).
- STEWART, F.C., R.F. LYNDON and J.T. BARBER: *J. Bot.* 52, 155 (1965).
- SUBDEN, R.E. and G. TURIAN: *Experientia* 26, 935 (1970).
- SUZUKI, Y. and D.D. BROWN: *J. Mol. Biol.* 63, 409 (1972).

- TASCA, R.J. and N. HILMAN: Nature 225, 1022 (1970).
- THEIMER, R.R.: Dissertation, Universität München (1968).
- und W. RAU: Biochim. Biophys. Acta 177, 180 (1969).
- und W. RAU: Planta 92, 129 (1970).
- TRUMAN, J.T. and S. FREDERIKSEN: Biochim. Biophys. Acta 182, 36 (1969).
- VALADON, L.R.G. and R. MUMMERY: Microbios 4, 227 (1971).
- VAN DE WALLE, C.: Febs 34, 31 (1973).
- VARNER, J.E. and G. RAM CHANDRA: Proc. Nat. Ac. Sci. U.S.A. 52, 100 (1964).
- VEDEL, F. and M.J. D'AOUST: Plant Physiol. 46, 81 (1970).
- ZELLWEGER, A. und R. BRAUN: Exptl. Cell Res. 65, 413 (1971).
- ZOMZLEY, C.E., S. ROBERTS and S. PEACHE: Proc. Nat. Ac. Sci. U.S.A. 67, 644 (1970).
- ZUCKER, M.: Plant Physiol. 44, 912 (1969).

Herrn Prof. Dr. W. Rau bin ich für die Überlassung des Themas, für die Anleitung zur Anfertigung der vorliegenden Arbeit und für seine unermüdliche Anteilnahme an allen wissenschaftlichen und persönlichen Belangen zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. H. Schraudolph, Gießen, bin ich für die großzügig gebotene Möglichkeit zur Einarbeitung in die Methodik der Extraktion und Chromatographie der Nukleinsäuren verbunden.

Herrn Prof. Dr. A. Böck und Herrn Prof. Dr. W. Klingmüller danke ich für viele praktische Hinweise und anregende Diskussionen und ihr Interesse am Fortgang der Arbeit.

Sehr herzlich danke ich auch Herrn Dr. E. Schmitt diel vom Staatl. Institut für Tierseuchenbekämpfung in Schleißheim für die bereitwillige Durchführung der Immunisierung.

Fräulein G. Dressler hat in dankenswerter Weise einige der Versuche mit Transkriptionshemmstoffen durchgeführt.

Fräulein A. Hesse danke ich für ihre sorgfältige und gewissenhafte Assistenz bei einem Teil der Versuche.

Am 13. Juli 1943 wurde ich, Erich Schrott, als drittes Kind des Kaufmanns David Schrott und seiner Ehefrau Stefanie, geb. Lermig, in Singen geboren. Nach dem vierten Volksschuljahr trat ich 1953 auf das Gymnasium in Singen über. Nachdem im Januar 1952 mein Vater und im August 1954 meine Mutter verstorben waren, war ich bis zum Abschluß der Mittleren Reife Internatsschüler der Heimschule "Maria Tann" bei Villingen, danach in der Oberrealschule Illertissen. Dort legte ich im Juni 1962 meine Reifeprüfung ab. Im selben Jahr wurde ich zum Wehrdienst einberufen und 1964 als Leutnant d. R. entlassen. Zum Wintersemester 1964/65 begann ich mit dem Biologiestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, wo ich im November 1969 die Diplom-Hauptprüfung ablegte. Im Jahre 1968 heiratete ich Frä. Astrid Mohr. Im Botanischen Institut der Universität München begann ich 1969 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. RAU mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit. Am selben Institut bin ich seit Januar 1971 wissenschaftlicher Angestellter.

